UNTERSUCHUNGEN ZUR OESTROGENAUSSCHEIDUNG IM SÄUGLINGS- UND KLEINKINDESALTER BEI BEIDEN GESCHLECHTERN

Ursula Kuhnle

1979

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus B e t k e

UNTERSUCHUNGEN ZUR OESTROGENAUSSCHEIDUNG IM SÄUGLINGS- UND KLEINKINDESALTER BEI BEIDEN GESCHLECHTERN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ursula K u h n l e
aus
Schwäbisch Gmünd
1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: PD Dr.med., Dipl.Biochem.F.Bidlingmeier

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med.K.Betke

Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen E l t e r n

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0006

Die vorliegende Arbeit entstand in der Kinderklinik der Universität München, Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke, auf die Anregung von Herrn Privatdozent Dr. med., Dipl. Biochem. F. Bidlingmaier. Ich möchte ihm für die stets bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen und für wertvolle Hinweise bei der Darstellung der Ergebnisse danken.

Herrn Prof. Dr. med. D. Knorr danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im endokrinologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik München und für seine ständige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt den Assistentinnen des Hormonlabors, im besonderen Frau M. Wagner sowie Fräulein A. Diepolder, Frau E. Grove, Fräulein C. Wohlfahrt, Fräulein A. Kapp und Fräulein A. Baumann für die freundliche Aufnahme und für die technische Beratung bei der Durchführung der Experimente.
Frau J. Willumeit möchte ich für die sorgfältige Ausführung der Schreibarbeiten danken.

I N H A L T

			Seite
1.	EINLEITUNG		1
	1.1.	Thema und Fragestellung	1
	1.2.	Biosynthese und Physiologie der Oestrogene	5
	1.3.	Methoden der Oestrogenbestimmung	10
	1.3.1.	Hydrolyse der Konjugate	10
	1.3.2.	Extraktion	12
	1.3.3.	Chromatographie	13
	1.3.4.	Quantitative Bestimmungsmethoden	13
		1.3.4.1. Colorimetrische und fluorimetrische Methoden	14
		1.3.4.2. Gaschromatographische Methoden	14
		1.3.4.3. Radioimmunologische Steroidbestimmung	15
2.	METHODIK		18
	2.1.	Reagentien	18
	2.2.	Vorversuche zur getrennten Bestimmung von Oestron und Oestradiol	20
	2.2.1.	Extraktion zur Oestrogenkonjugate mit Äther	21
	2.2.2.	Milde Säure - katalysierte Hydrolyse	22
	2.2.3.	Fremdaktivität der B-Glucuronidase aus E. coli	22
	2.2.4.	Inhibitoren der B-Glucuronidase und der Arylsulfatase	23
	2.2.5.	Interconversion von Oestradiol und Oestron	25

2.3.	Untersuchungen zur Optimierung der enzymatischen Hydrolyse der Oestrogenkonjugate	25
2.3.1.	Hydrolyse der Oestrogenglucuronide und - sulfate mit einem Enzymgemisch aus Helix pomatia	26
	2.3.1.1. pH-Optimum	26
	2.3.1.2. Optimale Inkubationstemperatur bei verschiedenen Enzymkonzentrationen	27
	2.3.1.3. Optimale Inkubationszeit bei verschiedenen Enzymkonzentrationen	27
2.3.2.	Hydrolyse der Oestrogenglucuronide mit einer ß-Glucuronidase aus E. coli	29
	2.3.2.1. pH-Optimum	29
	2.3.2.2. Optimale Inkubationszeit	29
2.4.	Zusammenfassende Darstellung der enzymatischen Hydrolyse	30
2.5.	Routinemäßige Durchführung der Bestimmung der verschiedenen Fraktionen von Oestron und Oestradiol im Urin	31
2.5.1.	Vorbereitung der Urinproben	31
	2.5.1.1. Hydrolyse und Extraktion	31
	2.5.1.2. Chromatographie	32
2.5.2.	Durchführung des Radioimmunoassay	33
	2.5.2.1. Standardkurve	33
	2.5.2.2. Radioimmunoassay	34
2.5.3.	Qualitätskontrolle	35
	2.5.3.1. Präzision	35
	2.5.3.2. Richtigkeit	36
	2.5.3.3. Empfindlichkeit	36
	2.5.3.4. Spezifität	37
	2.5.3.5. Praktikabilität	38
	2.5.3.6. Plausibilität	38

3. ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER METHODE 40

4. UNTERSUCHUNGEN AN SAUGLINGEN UND KLEINKINDERN 43

4.1. Untersuchungsmaterial 43

4.2. Auswertung und Statistik 43

4.3. Glucuronidfraktion der Oestrogene 44

4.4. Bestimmung der Sulfatfraktion und der Glucuronidfraktion der Oestrogene 44

4.5. Freies Oestron und freies Oestradiol 50

4.6. Verhältnis von Oestrogensulfat zu -Glucuronid 50

4.7. Verhältnis von Oestradiol zu Oestron 55

4.8. Längsschnittuntersuchungen 55

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 59

6. ZUSAMMENFASSUNG 69

7. LITERATURVERZEICHNIS 73

TRIVIALNAMEN UND ABKÜRZUNGEN

Androstendion	Androst-4-en-3, 17-dion
Cortison	Pregn-4-en-17, 21-diol-3, 11, 20-trion
cpm	Counts per minute (Zerfallsakte/min)
E_1, Oestron	Oestra-1,3,5 (10) trien, 3-ol, 17-on
E_2, 17ß-Oestradiol	Oestra-1,3,5 (10) trien, 3, 17ß-diol
E_3, Oestriol	Oestra-1,3,5 (10) trien, 3, 16 , 17ß-triol
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FU	Fishman-Einheiten (siehe Seite 18)
KG	Körpergewicht
LH	Luteinisierungshormon (=ICSH)
NS	nicht signifikant
RIA	Radioimmunoassay
Roy-U	Roy-Einheiten (siehe Seite 18)
SHBG	Sexualhormone bindendes Globulin
Testosteron	Androst-4-en-17ß-ol-3-on
Transcortin	Corticosteroide bindendes Globulin (CBG)
VK	Variationskoeffizient
$\bar{x} \pm \sigma$	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

1. EINLEITUNG

1.1. Thema und Fragestellung

Die Bestimmung der Oestrogene im Urin der geschlechtsreifen, besonders der schwangeren Frau bietet heutzutage wenig Schwierigkeiten und kann in jedem größeren Labor durchgeführt werden. Dagegen ist es weiterhin schwierig, die geringen Oestrogenkonzentrationen bei Frauen nach der Menopause, bei Männern und bei Kindern zu erfassen (56). Nur wenige der bisherigen Methoden waren so empfindlich, daß sie sich auch zur Messung der geringen Hormonkonzentrationen vor der Pubertät eigneten. KNORR et al. (105) konnten mit einer gaschromatographischen Methode die Oestron- und Oestradiolkonzentrationen im Urin präpubertärer Mädchen und Jungen zwar bestimmen, doch war diese Methode für routinemäßige Untersuchungen zu kompliziert.

Einen entscheidenden Fortschritt für die Untersuchung der hormonellen Veränderungen während der Kindheit und Pubertät brachte die Einführung der radioimmunologischen Bestimmungsmethoden in die Steroidanalytik (2). Erstmals konnten die äußerst geringen Konzentrationen der Sexualhormone auch im Serum von Säuglingen und Kleinkindern gemessen werden. Dabei wurden neue und völlig überraschende Ergebnisse erhalten (26, 81).

Schon vorher hatten FAIMAN und WINTER (74) nachgewiesen, daß die Konzentrationen der hypophysären Gonadotropine im Blut von Säuglingen sogar höher sind als bei Kindern in der späteren präpubertären Phase. Außerdem stellten sie interessante und unerwartete Geschlechtsunterschiede in dieser frühen Lebensperiode fest. Die männlichen Säuglinge zeigen einen kurzen aber steilen Anstieg der Serum-LH-Werte, mit Spitzenwerten im 2. und 3. Lebensmonat und, geringer ausgeprägt, auch der FSH-Werte. Nach dem 6. Monat sind bei Jungen keine erhöhten Gonadotropine mehr feststellbar. Bei den weiblichen Säuglingen ist der Anstieg des LH schwächer. Dagegen erreichen die weiblichen Säuglinge sehr viel höhere FSH-Werte als die männlichen,

allerdings mit einer breiten Streuung der Werte, die von der unteren Nachweisgrenze bis in den oberen Normalbereich der reifen Frau reicht. Vereinzelt erhöhte FSH-Spiegel werden noch bis ins 4. Lebensjahr gefunden (76).

Nahm man zuerst an, daß die hohen Gonadotropinspiegel Folge der Unfähigkeit der noch unreifen Gonaden seien, auf den Gonadotropinstimulus mit Hormonbildung zu reagieren und damit die feed-back-Kontrolle auf das Hypothalamus-Hypophysen-System auszuüben (183), so zeigten bald die Untersuchungen der Sexualhormone, daß die Gonaden sehr wohl auf den Gonadotropinstimulus reagieren können.

FOREST et al. (81) untersuchten radioimmunologisch die Testosteronspiegel im Serum von Neugeborenen und Säuglingen. Dabei stellten sie bei den männlichen Säuglingen nach der Geburt einen dem LH folgenden steilen Anstieg des Testosterons fest mit Spitzenwerten im 3. Lebensmonat, die spätpubertären Werten entsprechen. Nach dem 6. Monat werden keine hohen Werte mehr gefunden. Dieses Verhalten der Testosteronspiegel ist sehr regelmäßig und kann bei allen männlichen Säuglingen beobachtet werden. Bei gesunden Mädchen kommt es zu keiner Zeit zu vermehrter Testosteronbildung.

Auch die Untersuchungen der Oestrogenspiegel von Neugeborenen und Säuglingen durch BIDLINGMAIER et al. (26) lassen einen Anstieg wie auch Geschlechtsunterschiede erkennen, allerdings ist das Bild nicht so einheitlich wie beim Testosteron der Jungen. Die bei beiden Geschlechtern bei der Geburt sehr hohen Oestrogenwerte fallen zwar zunächst rasch ab und erreichen nach etwa 5 Tagen die späteren präpubertären Normalwerte nahe der unteren Nachweisgrenze. Dann jedoch steigen bei beiden Geschlechtern die Oestradiolwerte erneut an. Die Oestron- und Oestradiolspiegel weiblicher Säuglinge und Kleinkinder bis zum 24. Lebensmonat sind in Abb. 1, verglichen mit den Normalbereichen der verschiedenen Stadien der weiblichen Pubertät, dargestellt. Die weiblichen Säuglinge erreichen signifikant höhere Oestradiolwerte als die männlichen. Die höchsten Werte werden im 2. und 3. Lebensmonat gemessen. Die Streuung zu diesem Zeit-

punkt ist beträchtlich; die Spiegel variieren von der untern Nachweisgrenze bis in den oberen Normbereich des Stadiums 3 der weiblichen Pubertät - ein Stadium, in dem die Brustentwicklung bereits weit fortgeschritten ist. Nach dem 4. Lebensmonat fallen die Werte wieder ab, doch dauert dies länger als bei den männlichen Säuglingen. Noch im 2. Lebensjahr werden erhöhte Werte gefunden. Im Gegensatz zum Oestradiol sind die Oestronwerte bei beiden Geschlechtern gleichbleibend niedrig.

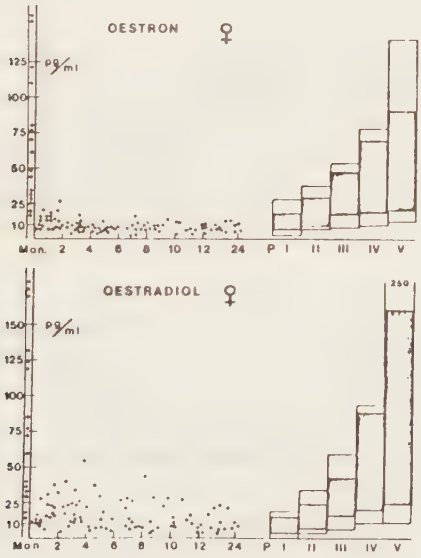


Abb. 1:
Plasmakonzentrationen von Oestron und Oestradiol weiblicher Säuglinge und Kleinkinder bis zum Alter von 2 Jahren verglichen mit den Normalbereichen der verschiedenen Stadien der weiblichen Pubertät (Säulen rechts im Bild). Der Bereich zwischen der 10. und 90. Perzentile wurde schraffiert dargestellt. Nach BIDLINGMAIER et al. (26)

Diese interessanten Ergebnisse geben ein noch unvollständiges Bild von den Vorgängen in der frühen Kindheit. Weitere Untersuchungen sind zur Klärung der Bedeutung der Sexualhormone in dieser Entwicklungsphase notwendig. So ist es noch völlig unklar, ob ähnlich wie beim Testosteron der Jungen bei allen Kindern ein regelmäßiger Oestrogenanstieg erfolgt. Obwohl es jetzt möglich ist, mit Hilfe sensitiver Methoden die Konzentrationen der Steroidhormone im Plasma exakt zu messen, sind wegen der benötigten großen Plasmamengen wiederholte Untersuchungen bei Säuglingen nicht vertretbar. Dagegen ist es für die Kinder wenig belastend, wenn Harn an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen gesammelt wird. Dadurch ist es möglich, bei einzelnen Kindern den individuellen Verlauf der Oestrogenausscheidung über einen längeren Zeitraum zu verfolgen.

Die erhöhten Oestrogenwerte im Plasma könnten auch, ohne daß tatsächlich eine vermehrte Hormonproduktion vorliegen muß, durch eine verminderte Ausscheidung der Sexualhormone verursacht werden. Die in einer über einen bestimmten Zeitraum gesammelten Urinprobe gefundenen Oestrogenmengen stellen daher einen wesentlich besseren Parameter für die Produktionsraten der Hormone dar als die Höhe der Plasmaspiegel.

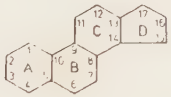
Aus älteren Untersuchungen ist bekannt, daß sich der foetale Oestrogenstoffwechsel wesentlich von dem Stoffwechsel des Erwachsenen unterscheidet (55, 57, 59, 60, 61, 131, 173). Hieraus ergibt sich die interessante Frage, inwieweit sich der Metabolismus des Säuglings von dem des Foeten einerseits und des Erwachsenen andererseits unterscheidet.

Zur Bestimmung von Oestron und Oestradiol im Urin entwickelten wir eine neue Methode, die sich besonders für den geringen Konzentrationsbereich der Oestrogene bei Säuglingen eignet. Diese praktikable und relativ einfache Methode ermöglicht die routinemäßige Bestimmung einer größeren Serie von Urinproben. Im 1. Teil dieser Arbeit wird unsere Methode, mit der wir 6 verschiedene Oestrogenfraktionen im Urin bestimmen können, vorgestellt. Im 2. Teil werden die Ergebnisse, die wir bei der Bestimmung dieser Oestrogene im Harn

von Säuglingen und Kleinkindern erhielten, mitgeteilt und diskutiert.

1.2. Biosynthese und Physiologie der Oestrogene

Die Bedeutung der Oestrogene als typische, weibliche Geschlechtshormone ist unumstritten. Chemisch stellen sie Steroide (Sexualsteroide) dar, mit dem Steran aus 3 Sechserringen (A, B, C) und einem Fünferring (D) als Grundgerüst. Struktur und Numerierung der C-Atome sind aus Abb. 2 ersichtlich.

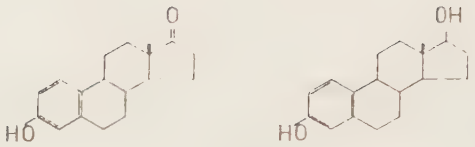


Steran

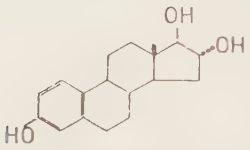
Abb. 2:
Schema des Steroidgerüstes

Bis 1953 kannte man nur Oestron, Oestradiol und Oestriol, die heute als die "klassischen Oestrogene" bezeichnet werden. Ihre Strukturformeln sind in Abb. 3 wiedergegeben.

Seither wurden mehr als 25 verschiedene Oestrogene - im wesentlichen Metaboliten der klassischen Oestrogene - aus menschlichen Körperflüssigkeiten, Geweben und Ausscheidungsprodukten isoliert, von denen allerdings nur wenige quantitativ oder qualitativ von Bedeutung sind.



Oestron Oestradiol



Oestriol

Abb. 3:
Strukturformeln der
3 klassischen Oestrogene

Die Oestrogene sind C18-Steroide, die als charakteristische Merkmale 1. den aromatischen A-Ring, 2. die phenolische OH-Gruppe an C - 3, sowie 3. eine weitere Sauerstoffunktion an C - 17 aufweisen. Besonders durch die phenolische OH-Gruppe reagieren die Oestrogene schwach sauer.

Die quantitativ bedeutendsten Organe für die Oestrogenbiosynthese außerhalb der Schwangerschaft sind das Ovar, die Testes und die Nebennierenrinde. Dort verläuft die heute weitgehend geklärte, komplizierte Biosynthese im wesentlichen auf dieselbe Weise (149, 154, 155, 156, 157, 167, 168, 189, 192, 193). Während

der Schwangerschaft werden große Mengen an Oestrogenen von der feto-placentaren Einheit (62) produziert. Die beiden als Hauptwege geltenden Synthesewege und die verschiedenen Querverbindungen (65, 121, 149, 153) sind in Abb. 4 dargestellt. Oestron und Oestradiol entstehen aus den männlichen Sexualhormonen Androstendion und Testosteron.

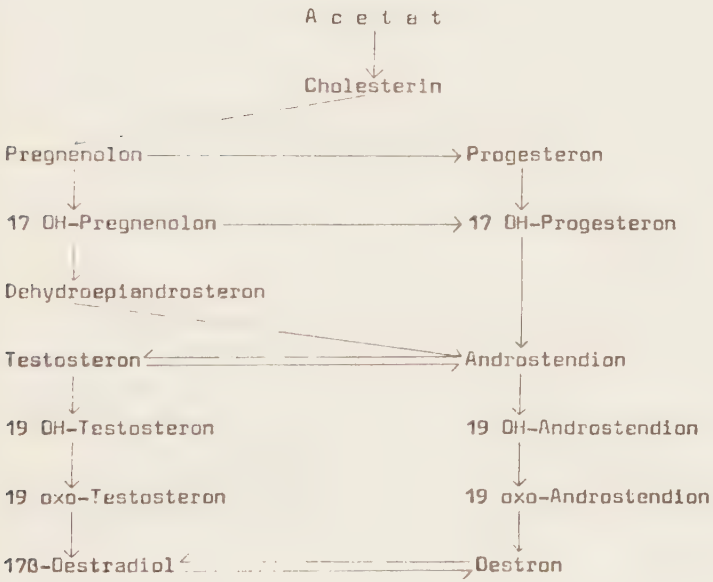


Abb.4
Wege der Biosynthese von 17ß-Oestradiol und Oestron

Bei der erwachsenen Frau stammt, außerhalb der Schwangerschaft, der größte Teil der Oestrogene aus dem Ovar. Die Oestrogenproduktion ist Gonadotropin-abhängig und ändert sich in den einzelnen Lebensabschnitten. Die regelmäßig fluktuierenden Oestrogenspiegel der erwachsenen Frau sind Folge der cyclischen

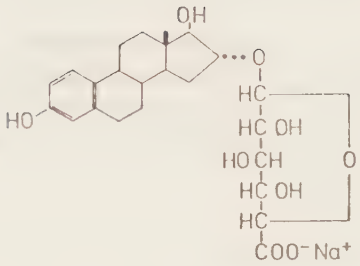
Stimulierung durch die Gonadotropine. Die Gonaden beider Geschlechter produzieren vorwiegend 17ß-Oestradiol. Dieses Oestrogen besitzt die stärkste hormonelle Wirkung. Oestron wird - zumindest beim Mann und der Frau nach der Menopause - hauptsächlich in der Nebennierenrinde oder aus dort stammenden Vorstufen gebildet(16, 17, 102, 160).Oestriol ist ein schwach wirksames Oestrogen und scheint im wesentlichen nur ein Ausscheidungsprodukt zu sein (70).

Die Oestrogene sind nur als freie, nicht an Protein gebundene Steroide biologisch aktiv. Die ins Blut sezernierten Oestrogene verschwinden rasch ins Gewebe oder werden nach ihrer Metabolisierung in der Leber und der Niere ausgeschieden. Die Halbwertszeit der zirkulierenden Oestrogene beträgt nur wenige Minuten (162). Die Metabolisierung und Inaktivierung der Oestrogene besteht hauptsächlich in ihrer weiteren Hydroxylierung und/oder Konjugierung mit verschiedenen Säuren.

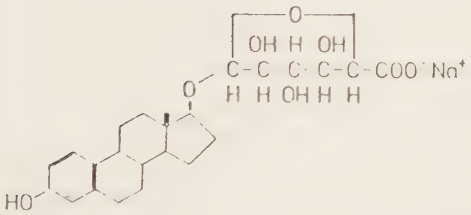
Durch Oxydation werden die Oestrogene zu höher polaren Verbindungen hydroxyliert, wobei die 16-Hydroxylierung quantitativ die größte Rolle spielt. Dabei entsteht als Hauptausscheidungsprodukt der Oestrogene Oestriol. Ein weiterer Hydroxylierungsschritt,der besonders in letzter Zeit Beachtung fand, ist die Hydroxylierung am C2-Atom (18, 77, 85, 86) zu den sogenannten Katecholoestrogenen. Daneben sind noch zahlreiche andere Hydroxylierungsprodukte isoliert worden (9, 34).

Die Ausscheidung der Oestrogene wird durch Konjugierung vor allem mit Glucuronsäure und Schwefelsäure ermöglicht. Diese Konjugate, die Glucuronide und Sulfate, sind gut wasserlöslich und können daher durch die Nieren mit dem Harn eliminiert werden.

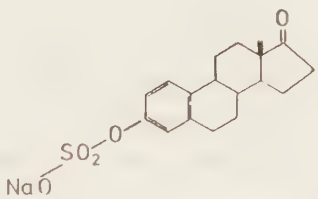
Beim Erwachsenen wird der größte Teil der Oestrogene als Glucuronid ausgeschieden. Nur ein geringer Prozentsatz liegt als Sulfat vor (39, 58). Die wichtigsten konjugierten Oestrogene zeigt Abb.5.



Oestriolglucuronid
(Natriumsalz)



Oestradiolglucuronid
(Natriumsalz)



Oestronsulfat
(Natriumsalz)

Abb. 5:
Strukturformeln der wichtigsten Oestrogenkonjugate

Im Gegensatz zum Erwachsenenstoffwechsel wurden bei menschlichen Foeten und Neugeborenen aus Geweben und Ausscheidungsprodukten vorwiegend Sulfokonjugate isoliert (59, 60, 91, 131, 132). Die Bedeutung dieses Unterschiedes im Stoffwechsel ist nicht geklärt. Interessant in diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von BREUER et al. (34), die zeigten, daß Oestronsulfat zu einem viel größeren Prozentsatz metabolisiert wird als das freie Oestron. Dabei entsteht aus Oestronsulfat vor allem Oestradiol-17β 3-monosulfat, aus dem leicht 17β-Oestradiol abgespalten wird. Da 17β-Oestradiol das

hormonell aktivste Oestrogen ist, deutet dieser Befund darauf hin, daß Konjugate nicht nur Ausscheidungsprodukte sein müssen.

Die ausgeprägte Sulfatisierung in der Neugeborenenperiode ist aber keine Besonderheit des Oestrogenmetabolismus. Andere Steroide, wie zum Beispiel Cortison (1, 103, 130) und Testosteron (112), werden in dieser Zeit ebenfalls überwiegend als Sulfate ausgeschieden.

1.3. Methoden der Oestrogenbestimmung

Die Bestimmung der Oestrogene im Urin umfaßt 4 Phasen:

1. Hydrolyse der Konjugate
2. Extraktion
3. Chromatographie
4. Quantitative Bestimmung

1.3.1. Hydrolyse der Konjugate

Da die Bestimmung der Steroidkonjugate selbst äußerst kompliziert ist, ist ihre Hydrolyse eine wichtige Stufe bei nahezu allen Steroidbestimmungsmethoden, auf die nur selten verzichtet wurde (54a, b). Die Hydrolyse der Steroidkonjugate, und hier insbesondere der Oestrogenkonjugate, kann auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden, entweder durch Säureeinwirkung oder durch enzymatische Spaltung.

Schon 1933 beobachtete MARRIAN (122), daß nach längerem Stehenlassen bei Zimmertemperatur im Urin Bakterien wuchsen, die Steroidkonjugate spalten konnten. Der erste absichtliche Versuch einer enzymatischen Spaltung gelang VEITCH et al. (176) an Pregnandiol-3-glucuronid mit einem Pflanzenextrakt, genannt Emulsin. In der folgenden Zeit begannen intensive Arbeiten an verschiedenen Organpräparationen, insbesondere Milz und Leber (79, 172) und Mikroorganismen wie zum Beispiel E. coli (42), die zum Teil hervor-

ragende Glucuronidase-Aktivität besitzen. Der erste Bericht über eine Sulfataseaktivität einer Pilzpräparation stammt von BUTENANDT und HÜFSTETTER (50). Versuche, auch aus Säugetiergewebe Sulfatasepräparate zu gewinnen, wurden von ROY (152) durchgeführt, allerdings waren die gewonnenen Extrakte nie aktiv genug, um sie bei der Bestimmung von Steroidkonjugaten einsetzen zu können. In genügend hoher Konzentration konnten Sulfatasepräparate nur aus Pilzen und Schnecken gewonnen werden. Allen Sulfatasen gemeinsam ist eine hohe Substratspezifität (64, 82). So spaltet zum Beispiel die Sulfatase aus der Schnecke Helix pomatia, die häufig zur Oestrogenkonjugatspaltung verwendet wird, nur die Sulfatbindung am phenolischen A-Ring (98, 151).

Die routinemäßige Anwendung der enzymatischen Hydrolyse zur Steroidkonjugatspaltung begann etwa 1950 mit der Einführung handelsüblicher Rinderleberpräparationen, wie zum Beispiel der Ketodase (Warner-Chilcott Laboratories),die eine stark angereicherte ß-Glucuronidase darstellt. Große Bedeutung gewann auch ein Präparat aus dem Magensaft der Schnecke Helix pomatia, ein Gemisch aus ß-Glucuronidase und Sulfatase, das die meisten bekannten Steroidkonjugate spaltet (96).

Die billigere und schnellere und daher zunächst weitverbreitete Methode zur Spaltung der Steroidkonjugate ist aber die Säurehydrolyse, eine Methode, die erstmals 1935 von SMITH und SMITH (166) durchgeführt wurde. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Versuchsbedingungen untersucht. Da einige Steroide, vor allem die Oestrogene, durch Säureeinwirkung teilweise zerstört werden können (44, 58), galt es, einen brauchbaren Kompromiß zwischen maximaler Freisetzung und minimaler Zerstörung zu erreichen. Die Entwicklung auf diesem Gebiet wurde ausführlich dargestellt von MARRIAN und BAULD (123), die als beste Methode 1-stündiges Kochen des Urins mit 15 Vol.% konzentrierter HCl, angeben.

Diese Säurehydrolyse wurde von BROWN und BLAIR (38) mit der enzymatischen Hydrolyse der Oestrogenkonjugate verglichen. Dabei stellten sie bei der Säurehydrolyse Verluste bis zu 20% fest. Ein

weiterer Nachteil der Säurehydrolyse ist die Entstehung unspezifischer Chromogene und die Zunahme ätherlöslicher Substanzen, die bei der anschliessenden photometrischen Mengenbestimmung der Steroide eine weitere Fehlerquelle darstellen (31).

Um diese Fehler zu vermeiden und dabei trotzdem die relativ teure und zeitraubende enzymatische Hydrolyse nicht benützen zu müssen, wurde von verschiedenen Gruppen eine mildere Form der säurekatalysierten Hydrolyse entwickelt. Dabei wird der schwach saure Urin mit verschiedenen Lösungsmitteln wie zum Beispiel Äther, Dioxan, Tetrahydrofuran oder Äthylacetat, bei Zimmertemperatur inkubiert. Allerdings ließ sich auf diese weise nur die Hydrolyse ganz bestimmter Steroidkonjugate erreichen (43, 53, 95, 117).

1.3.2. Extraktion

Nach der Hydrolyse der Steroidkonjugate, müssen die freigesetzten Steroide extrahiert werden.

Alle natürlichen Oestrogene sind Steroide mit einem aromatischen Ring. Neben weniger polaren Hydroxyl- oder Ketogruppen am D-Ring besitzen sie eine oder mehrere phenolische OH-Gruppen am A-Ring. In organischen Lösungsmitteln wie Benzol, Chloroform, Äther, Aceton und Alkohol sind sie leicht, in Wasser dagegen schwer löslich. Durch die höhere Polarität der phenolischen OH-Gruppen sind sie jedoch in wässerigen Alkalien löslich, wodurch ihre Trennung von anderen, weniger polaren Steroiden, zum Beispiel Androgenen derselben Harnprobe, ermöglicht wird. COHEN und MARRIAN (52) haben 1934 ein Verfahren beschrieben, nach dem aufgrund unterschiedlicher Lösungseigenschaften Oestriol in Alkali von Oestron und Oestradiol und von diesen beiden wiederum die übrigen Steroide als Neutralfraktion abgetrennt werden können.

Die Verteilungskoeffizienten der einzelnen Oestrogene in den verschiedenen organischen Lösungsmitteln, wurden von ENGEL (72) und BROWN (36), ausführlich bestimmt. Danach lassen sich die Oestrogene mit Diäthyläther, einem Lösungsmittel, das sich schon

seit langem bei der Extraktion der Steroide bewährt hatte, annähernd quantitativ aus dem Urin extrahieren, vorausgesetzt, daß eine Emulsionsbildung des Urins vermieden wird.

1.3.3. Chromatographie

Die weitere Reinigung und Trennung der Oestrogene hängt davon ab, welche Fraktion bestimmt werden soll und welche Bestimmungsmethode verwendet wird. Je spezifischer eine Bestimmungsmethode für ein einzelnes Steroid oder eine Gruppe von Steroiden ist, desto weniger aufwendig müssen störende Substanzen entfernt werden.

Für die Trennung der Oestrogene sind verschiedene Methoden geeignet. Verwendet wird
1. die Lösungsmittelverteilung (55, 71, 83), bei der die unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der einzelnen Oestrogene in verschiedenen Lösungsmitteln zu ihrer Trennung ausgenützt werden;
2. die Papier- und Dünnschichtchromatographie (32, 47, 78, 113, 120, 188), die eine gute Trennung der Steroide ermöglichen, aber die Mengenbestimmung beeinträchtigen können, da bei der anschließenden Elution Verluste und Verunreinigungen auftreten;
3. die Ionenaustauschchromatographie (11, 30, 48, 89, 124, 125, 134, 140, 163) zum Beispiel mit Amberlite, die die Isolierung konjugierter Steroide aus dem Urin ermöglicht;
4. die Säulenchromatographie an Aluminiumoxyd (22, 36, 115), Celite (5, 21, 35, 146, 161) oder an Sephadex (8, 23, 114, 133), die die saubere Trennung auch kleinster Steroidmengen erreichen - eine wichtige Voraussetzung für gaschromatographische oder radioimmunologische Bestimmungsmethoden der Steroide.

1.3.4. Quantitative Bestimmungsmethoden

Der letzte Schritt der Oestrogenbestimmung besteht in der Mengenbestimmung des Steroids. Während bei der Messung größerer Oestrogenmengen colorimetrische oder fluorimetrische Methoden verwendet werden können, sind zur Bestimmung geringer Oestrogenmengen nur gas-

chromatographische - oder Radioisotopenmethoden geeignet. Die früher angewandten biologischen Methoden besitzen heute nur noch historisches Interesse, da sie zwar sehr spezifisch, aber kaum standardisierbar waren. Die Ergebnisse schwankten in Abhängigkeit von Tiermaterial, Testorgan und äußeren Umständen, die von Labor und Tierhaltung abhingen, so daß Werte verschiedener Labors nur schwer miteinander vergleichbar waren (70).

1.3.4.1. Colorimetrische und fluorimetrische Methoden

BROWN (36) und BAULD (20) entwickelten eine Bestimmungsmethode, die auf einer spezifischen Farbreaktion der Oestrogene, der Kober-Reaktion (107), beruht. Damit konnten die 3 klassischen Oestrogene getrennt, colorimetrisch gemessen werden. Die Methode eignete sich gut zur Untersuchung von Schwangerenurin, für die Bestimmung geringer Oestrogenkonzentrationen war sie zu unempfindlich (45).

Später ersetzten BROWN et al. (40) die Colorimetrie in ihrer Methode durch die Fluorimetrie und fügten einen weiteren Extraktionsschritt hinzu (94). Dadurch konnte zwar die Empfindlichkeit der Methode wesentlich verbessert werden (37), aber für die Oestrogenbestimmung bei Kindern erweist sie sich weiterhin als zu unspezifisch.

1.3.4.2. Gaschromatographische Methoden

Große Erwartungen wurden in die Oestrogenbestimmung mit Gaschromatographen (GLC) gesetzt. Man hoffte, endlich auch für die Bestimmung kleinster Oestrogenmengen eine zuverlässige und praktikable Methode gefunden zu haben. Die Analyse von Schwangerenurin war bald einfach zu handhaben (7, 69, 175, 187), aber die Bestimmung von geringen Hormonkonzentrationen stieß auf ähnliche Schwierigkeiten wie bei den photometrischen Methoden. Der für die gaschromatographische Untersuchung von Steroiden benützte Flammenionisationsdetektor ist unspezifisch. Deshalb sind auch für die Steroidbestimmungen ausgiebige und zeitraubende Reinigungsschritte nötig, so daß die meisten gaschromatographischen Methoden zur Oestrogenbestimmung außerhalb der Schwangerschaft routinemäßig nicht verwendet werden.

Eine größere Empfindlichkeit und Spezifität wird durch die Verwendung von Elektroneneinfangdetektoren (68 , 190) erreicht. KNORR

et al. (105) konnten mit einer entsprechenden, allerdings auch sehr aufwendigen Methode, Oestron im Harn von präpubertären Mädchen und Knaben nachweisen die, noch geringeren Oestradiolmengen konnten sie auch mit dieser Methode nicht erfassen.

Fast gleichzeitig wurde die Doppelisotopen-Derivat-Methode entwickelt (14, 93, 170, 171). Diese sehr spezifische und empfindliche Methode ist ebenfalls ungemein zeitraubend und arbeitsaufwendig. Rasch konnte deshalb die einfach zu handhabende radioimmunologische Bestimmungsmethode diese umständlichen Verfahren verdrängen.

1.3.4.3. Radioimmunologische Steroidbestimmung

Der entscheidende Fortschritt bei der Bestimmung auch kleinster Hormonmengen wurde durch die Einführung der radioimmunologischen Bestimmungsmethoden in die Hormonanalytik gemacht (24). War zuerst nur die Messung von Proteohormonen möglich, so wurden bald auch Radioimmunoassays zur quantitativen Bestimmung von Steroiden entwickelt (2,4). Dies war durch die Erkenntnis möglich geworden, daß auch gegen Steroide Antikörper erzeugt werden können (73, 118).

Das Prinzip der radioimmunologischen Steroidbestimmung beruht auf dem der kompetitiven Proteinbindung (135). Proteinbindung bedeutet die Bildung eines mehr oder weniger festen Komplexes zwischen einem Protein und einem oft niedermolekularen Stoff, dem Liganden. Physiologischerweise werden Steroid-Protein-Komplexe von den Transportglobulinen des Plasmas, Transcortin und Sexualhormon-bindendem Globulin und verschiedenen Rezeptorproteinen aus Niere, Prostata, Uterus usw. gebildet. Diese Proteine werden zum Teil ebenfalls als Reagenzien für kompetitive Proteinbindungsanalysen eingesetzt (66, 109, 126, 164).

Wegen ihrer hohen Stabilität, Spezifität und Sensitivität, sind heutzutage Antikörper gegen Steroide als Reagenz für die Proteinbindungsanalyse am weitesten verbreitet. Die radioimmunologische Methode beruht auf der Konkurrenzreaktion von radioaktiv markiertem und unmarkiertem Antigen um die Bindungsstellen am Antikörper.

Sie werden im Verhältnis ihrer Konzentrationen gebunden. Hält man die Konzentrationen von Antikörper und radioaktivem Antigen konstant, so werden um so weniger radioaktive Moleküle gebunden, je mehr nicht radioaktive dem Ansatz hinzugegeben werden (Abb. 6). Um die gebundene Radioaktivität messen zu können,ist die Trennung der freien Antikörper von den gebundenen Molekülen notwendig. Eine einfache und billige Methode ist die Adsorption der freien Steroide an Dextranbeschichtete Holzkohle (Dextran-coated-charcoal) (25, 137).

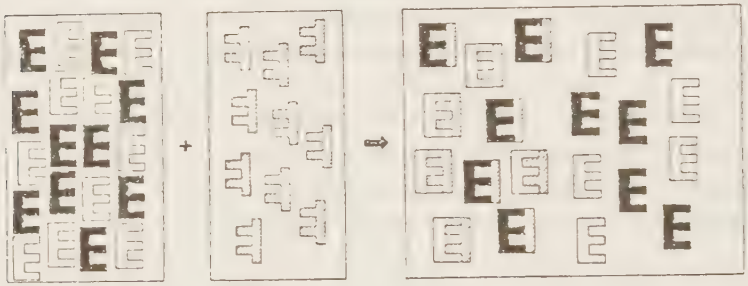


Abb. 6:
Prinzip des Radioimmunoassay. (Mod. nach Pfannenstiehl (142).
= Hormonmolekül, = markiertes Hormonmolekül, = Antikörper, = Hormon-Antikörper-Komplex.

Nach Abzentrifugieren der Kohle repräsentiert die Radioaktivität im Überstand den am Antikörper gebundenen Anteil des radioaktiven Steroids. Anhand einer Eichkurve, die mit bekannten Mengen (Standards) des Steroids erstellt wird, kann die unbekannte Steroidmenge in einer Probe ermittelt werden.

Der große Fortschritt hinsichtlich der Empfindlichkeit, der mit der radioimmunologischen Bestimmungsmethode erzielt wurde, geht aus einer Zusammenstellung der Nachweisgrenzen verschiedener Steroidbestimmungsmethoden in Tab. 1 hervor.

Tabelle I

Nachweisgrenzen verschiedener Steroidbestimmungsmethoden
(nach NIESCHLAG und WICKINGS (137)

Methode			
Biologische Methoden	100	-	10 000
UV-Absorption und Colorimetrie	100	-	2 000
Fluorimetrische Methoden	5	-	50
Doppelisotopen-Derivatbildung	0.5	-	10
Gaschromatographie			
- Flammenionisations-Detektor	5	-	20
- Elektroneneinfang-Detektoren	0.05	-	1.0
Proteinbindungsanalysen			
- Plasma-Protein	1	-	10
- Rezeptor-Proteine	0.01	-	0.1
- Antiseren	0.005	-	0.1

2. METHODIK

2.1. Reagentien

Enzympräparate:

β-Glucuronidase / Arylsulfatase aus Helix pomatia
EC 3.2.1.31 / EC 3.1.6.1. (Boehringer, Mannheim)

Aktivität der β-Glucuronidase: ca. 5.2 U/ml bei 38° C
und Phenolphthaleinmonoglucuronid als Substrat
= 100 000 Fishman-Einheiten/ml (FU/ml)

Aktivität der Arylsulfatase: ca. 2.6 U/ml bei 38° C und
Phenolphtalein-disulfat als Substrat
= 800 000 Roy-Einheiten/ml (Roy-U/ml

β-Glucuronidase aus E.coli (Institut Pasteur Produktion)

Aktivität: ca. 200 I.E./ml bei 37° C und Paranitrophenyl-
β-D-glucuronid als Substrat
= 40 000 Fishman-Einheiten/ml

Pufferlösungen:

0.1 M Natriumacetatpuffer pH 5.4
118 ml Essigsäure 0.1 M + 100 ml Natronlauge 0.1 M
(Merck, Darmstadt)

Phosphat-Albumin-Puffer pH 7.2 = Assay-Puffer
2.68 g KH_2PO_4
8.35 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
0.32 g NaN_3
1.0 g - Globulin (aus Rinderserum, lyophhilisiert reinst,
Behringwerke)
Aqua bidest. ad 100 ml

Organische Lösungsmittel

Methanol für Waschzwecke
Methanol pro analysi (Merck, Darmstadt)
Benzol pro analysi (Merck, Darmstadt)
Diäthyläther pro narcosi (Hoechst, Frankfurt/Main)

Säulenchromatographie

Sephadex LH 20 (Pharmacia Uppsala)

Tracer-Substanzen

Oestradiol- 2, 4, 6, 7- ^3H (110 Ci/mmol)

Oestron- 2, 4, 6, 7-^{3}H (88 Ci/mmol)
(beide: Radiochemical Centre Amersham)

Oestradiol- 6, 7-^{3}H-17ß-D-Glucuronid (45,6 Ci/mmol)

Oestron- 6, 7-^{3}H-Sulfat, Ammoniumsalz (42 Ci/mmol)
(beide: New England Nuclear, Boston)

Standardsubstanzen

17ß-Oestradiol: Oestra- 1, 3, 5 (10) trien, 3, 17ß-diol
Oestron : Oestra- 1, 3, 5 (10) trien, 3-ol, 17-on
(beide: Merck, Darmstadt)

17ß-Oestradiol-3-sulfat (Natriumsulfat)
Oestronglucuronid (Natriumsalz)
(beide: Steraloids, Inc., Wilton, USA)

Dextran-Aktivkohle-Suspension

0.5 g Norit A (Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg)
0.05 g Dextran T 70 (Pharmacia Uppsala)
Puffer pH 7.2 ad 100 ml

Szintillationsflüssigkeit

100 g Naphtalin (Zinsser, Frankfurt)
14 g PPO (2,5- Diphenyl- oxazol, Zinsser, Frankfurt)
0,6 g POPOP (1,4- bis- 2- (5-Phenyloxazolyl)-Benzol, Zinsser, Frankfurt)
1000 ml Dioxan (Merck, Darmstadt)

Antiserum AT/72-041071

Das Antiserum wurde von einem Kaninchen gewonnen, das mit einem 17ß-Oestradiol-Protein-Konjugat immunisiert worden war (25). Dieses Antiserum, AT/72-041071, wird in einer Verdünnung mit Assay-Puffer 1:7000, verwendet. 500 ul dieser Verdünnung binden etwa 20 pg Oestradiol.

Tabelle II zeigt die Kreuzreaktion quantitativ und qualitativ wichtiger Steroidhormone mit dem Antikörper. Oestron und Oestradiol werden etwa gleich stark gebunden und können daher mit demselben Antiserum gemessen werden. Die Affinität zu Oestriol ist deutlich geringer. Eine Kreuzreaktion mit nicht phenolischen Steroiden findet im physiologischen Konzentrationsbereich nicht statt.

Geräte

Der Radioimmunoassay wurde in Einmal-Glasröhrchen von 75 x 11 mm ausgeführt. Alle Glasgeräte werden vor Gebrauch in Methanol gewaschen und nach dem Trocknen durch Ausheizen bei 500°C in einem Heraeus-Ofen TA 500 von kontaminierenden Steroiden gereinigt (106).

Die Radioaktivität wurde in dem Flüssigkeitsszintillationszähler betaszint, BF 5003 (Berthold + Frieseke, Wildbad) gemessen.

Tabelle II

Kreuzreaktionen einiger SteroidHormone mit dem Oestrogen-Antiserum AT/72-041071 (nach BIDLINGMAIER et al. 25)

Oestron	100 %
Oestradiol	100 %
Oestriol	3 %
Cortisol	< 0.1 %
Corticosteron	< 0.1 %
DHEA	< 0.1 %
Testosteron	< 0.1 %
Androstendion	< 0.1 %
Progesteron	< 0.1 %
17-OH-Progesteron	< 0.1 %
DOC	< 0.1 %
Aldosteron	< 0.1 %

2.2. Vorversuche zur getrennten Bestimmung von Oestron und Oestradiol

In den folgenden Kapiteln soll eine neue Methode zur Bestimmung niedriger Konzentrationen von Oestron und Oestradiol im Urin beschrieben werden. Diese Methode wurde aus dem im endokrinologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik München verwendeten Radioimmunoassay für Plasmaoestrogene entwickelt.

Die Probenvorbereitung mußte völlig neu erarbeitet werden. Wichtigster Schritt dabei ist die Spaltung der Steroidkonjugate, da aufgrund der Spezifität des zur Verfügung stehenden Antiserums, nur die unkonjugierten Oestrogene im Radioimmunoassay gemessen werden können. Wegen der äußerst geringen Oestrogenkonzentrationen, die

wir bei Säuglingen und Kleinkindern erwarten, wurde die schonende enzymatische Hydrolyse zur Konjugatspaltung gewählt. Die klassische Säurehydrolyse, bei der die Oestrogene bis zu 20% zerstört werden (38, 71, 101), wurde nicht näher untersucht. Nur kurz wird auf eine milde Form der Säurehydrolyse eingegangen, die gelegentlich besonders zur Hydrolyse der Steroidsulfate (11, 46) vorgeschlagen wird.

Ausführlich wurden die Reaktionsbedingungen der enzymatischen Hydrolyse untersucht. Dabei wurden die optimalen Bedingungen für die Spaltung der einzelnen Oestrogenkonjugate, die in Tab. III zusammengestellt sind, erarbeitet. Zur Kontrolle der vollständigen Spaltung wurden Oestrogenkonjugate, die am Steroidmolekül radioaktiv markiert sind, verwendet.

Außerdem wurden zwei Phänomene, die bei der enzymatischen Hydrolyse auftreten sollen, näher untersucht. Dies sind: erstens die Existenz und Wirkung von Inhibitoren (116) gegen die verschiedenen Enzympräparationen, und zweitens die Interconversion von Oestradiol zu Oestron (153, 165) und umgekehrt

Tabelle III

Oestron- und Oestradiolfraktionen, die mit der hier beschriebenen Methode erfaßt werden

Oestron-sulfat	17β-Oestradiol-3 sulfat
Oestron-glucuronid	17β-Oestradiol-3 glucuronid
	17 α-Oestradiol glucuronid

2.2.1. Extraktion der Oestrogenkonjugate mit Äther

Um zu prüfen, ob die noch ungespaltenen Oestrogenkonjugate mit Äther extrahiert werden können und dadurch Ergebnisse verfälschen,

wurde dieser Versuch durchgeführt.

In 10-fachem Ansatz wurden zu 1 ml Urin und 3 ml Puffer von pH 5.4 radioaktiv markierte Oestrogenkonjugate gegeben. Anschließend wurde zweimal mit 10 ml Äther extrahiert. Nach Abdampfen des Äthers konnte im Rückstand keine Radioaktivität nachgewiesen werden. Es wurden also unter diesen Reaktionsbedingungen keine Oestrogenkonjugate mit Äther extrahiert.

2.2.2. Milde Säure-katalysierte Hydrolyse

Einzelne Steroidkonjugate, besonders die Sulfate der 17-Ketosteroide und der Oestrogene, sollen schon bei einem pH von 1 und durch eine nur geringe Temperaturerhöhung gespalten werden können (11, 46). Dabei werden, im Gegensatz zur klassischen Säurehydrolyse, die Oestrogene nicht zerstört (71, 101).

Zur Testung dieser milden Säure-katalysierten Hydrolyse wurden zu 2 ml Urin solange 0.1 n HCl zugesetzt, bis ein pH von 1 erreicht war. Zur Kontrolle der Spaltung wurde radioaktiv markiertes Oestronsulfat verwendet. Nach 24-stündiger Inkubation bei 60° C wurde zweimal mit 10 ml Äther extrahiert. Die im Extrakt enthaltene Radioaktivität, die die freigesetzten Steroide repräsentiert, betrug in den einzelnen Proben mit einer breiten Streuung 10 - 30% der eingesetzten Aktivität. Damit ist diese Methode zur Spaltung von Oestronsulfat ungeeignet.

2.2.3. Fremdaktivität der β-Glucuronidase aus E. coli

Zur Hydrolyse der Oestrogenglucuronide soll eine β-Glucuronidase aus E. coli verwendet werden. Da der Anteil der Oestrogenglucuronide getrennt von den Oestrogensulfaten bestimmt werden soll, muß die β-Glucuronidase Präparation frei von Sulfataseaktivität sein. Zur Prüfung der Reinheit wurde daher markiertes Oestronsulfat mit β-Glucuronidase aus E. coli 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die mit Äther extrahierbare Radioaktivität, die

das freie Oestron darstellt, gemessen. In allen Proben lag sie unter der Nachweisgrenze; damit enthält die verwendete Enzympräparation keine wesentliche Sulfataseaktivität

2.2.5. Inhibitoren der ß-Glucuronidase und der Arylsulfatase

Als wichtigste Störfaktoren, die die allgemeine Anwendung der enzymatischen Hydrolyse bisher behinderten, gelten Enzyminhibitoren, die im Untersuchungsmaterial vorhanden sein können. Obwohl die Existenz von Glucuronidase- und Sulfataseinhibitoren im Urin als sicher gelten kann, ist die Frage offen, inwieweit sie unter den üblichen Hydrolysebedingungen tatsächlich eine Rolle spielen.

Als bedeutendsten Inhibitor der ß-Glucuronidase beschrieb LEVVY 1962 (116) das Saccharo-1,4-lacton. Verschiedene Methoden zur Elimination dieser Verbindung aus dem Urin sind seither beschrieben worden. So empfahlen ZUMOFF und BRADLOW (194) lediglich eine Erhöhung der Enzymkonzentration, VOIGT (179) ein kurzfristiges Erhitzen des Urins auf 100° C, und HARKNESS (90) gibt an, daß es schon durch Stehenlassen des Urins bei Zimmertemperatur zur Ringöffnung und damit zur Inaktivierung dieses Inhibitors kommt.

Als Inhibitoren der Arylsulfatase gelten vor allem Sulfat- und Phosphationen. Die störende Wirkung dieser Ionen kann durch Verdünnen des Urins (92) weitgehend ausgeschaltet werden. Wirkungsvoller ist die Praezipitation mit $BaCl_2$ (97); dabei besteht allerdings die Gefahr, daß ein Teil der Steroidkonjugate mit ausgefällt wird (98).

Eine weitere Möglichkeit, die Enzyminhibitoren zu eliminieren, ist die Abtrennung der Steroidkonjugate vor der enzymatischen Hydrolyse. Dafür gibt es zwei prinzipiell verschiedene Möglichkeiten:

1. Extraktion der Steroidkonjugate durch hochpolare Lösungsmittel, u.a. durch n- Butanol, Cyclohexanol (88), Äther-Äthanol-Gemische

(67) oder Äthylacetat (29, 139). Über die Ausbeute der verschiedenen Verfahren berichtete ausführlich HORNEL (110).

2. Adsorption der Steroidkonjugate an geeignete Ionenaustauscherharze, zum Beispiel Amberlite XAD (11, 30, 49) oder an Sephadex (8, 23, 114).

Diese Methoden ermöglichen die Herstellung sehr reiner Urinextrakte, sind aber, da sie einen zusätzlichen Arbeitsgang darstellen, zeitraubend und relativ aufwendig.

Da hier vor allem eine praktikable Methode zur Bestimmung der Oestrogene in größeren Serien von Urinproben entwickelt werden soll, wurde zuerst mit der einfachen Methoden geprüft, ob tatsächlich Inhibitoreffekte in unserem Untersuchungsmaterial auftreten.

Dazu wurden die verschiedenen Enzympräparate getrennt untersucht:

1. β-Glucuronidase aus Helix pomatia

   Zu einer definierten Menge radioaktiv markierten Oestradiolglucuronids in 1 ml Urin und 3 ml Puffer pH 5.4, wurde das Enzymgemisch aus Helix pomatia, entsprechend 500 Fu β-Glucuronidase-Aktivität, hinzugegeben.
   Zu einem zweiten analogen Ansatz wurde nach dem Vorschlag von HARNESS (90) dieselbe Menge Enzym erst nach 24-stündiger Vorinkubation bei 37° C hinzugegeben. Beide Ansätze wurden mit Enzym jeweils 30 Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend die freien Steroide mit Äther extrahiert. Die Messung der Radioaktivität, die die gespaltenen Steroide in den Extrakten reräsentiert,ergab 81 ± 5% Spaltung im Ansatz ohne Vorinkubation, gegenüber 99.5 ± 0.5% Spaltung nach Vorinkubation ($\bar{x} \pm \delta$, n = 10).

2. β-Glucuronidase aus E. coli

   Bei der Prüfung dieser Glucuronidase ergaben die Kontrollversuche eine vollständige Spaltung nach 30 minütiger Inkubation.

3. Arylsulfatase aus Helix pomatia

Zur Hydrolyse der Oestrogensulfate mit Arylsulfatase wurde zu einer definierten Menge radioaktiv markierten Oestronsulfats in 1 ml Urin und 3 ml Puffer vom pH 5.4 das Enzymgemisch aus Helix pomatia (4000 Roy-Einheiten Sulfatase Aktivität) gegeben. Nach 12 Stunden war Oestronsulfat zu 98 $\pm$ 2% gespalten ($\bar{x} \pm 6$, n = 10).

Zusammenfassend bestätigten diese Untersuchungen die Existenz von Inhibitoren der Helix pomatia ß-Glucuronidase im Urin. Die Wirkung dieser Inhibitoren war nicht sehr gravierend und konnte durch Stehenlassen des Urins bei 37° C beseitigt werden. Daher soll für die weiteren Untersuchungen jeder Ansatz vor Zugabe des Enzyms 24 Stunden bei 37° C vorinkubiert werden.

Bei der Hydrolyse durch Coli-ß-Glucuronidase traten keine störenden Inhibitoreffekte auf.

Die Hydrolyse durch die Arylsulfatase aus Helix pomatia verlief zwar langsam aber ebenfalls vollständig. Da für die vorliegende Arbeit keine schnelle Methode zur Oestrogenbestimmung entwickelt werden muß, ist dieses Ergebnis voll zufriedenstellend.

2.2.5. Interconversion von Oestradiol und Oestron

Von verschiedenen Autoren (153, 165) wurden Redoxreaktionen zwischen Oestradiol und Oestron beschrieben, die durch ß-Glucuronidase Präparate katalysiert wurden. Diese Prozesse, die stark vom pH des Reaktionsmilieus und der Herkunft und Konzentration der verschiedenen Enzympräparate abhängen, lassen sich durch Verunreinigungen der Enzympräparate mit Oxidoreduktasen erklären. Es ist deshalb wichtig, besonders, wenn die einzelnen Oestrogenfraktionen getrennt bestimmt werden sollen, zu prüfen, inwieweit unter den eigenen Versuchsbedingungen solche Reaktionen stattfinden.

In jeweils 10-fachem Ansatz wurde zu 1 ml Urin und 3 ml Puffer pH 5.4, markiertes Oestronsulfat bzw. Oestradioglucuronid gegeben. Beide Testreihen wurden mit beiden Enyzmpräparaten, der bakteriellen β-Glucuronidase und dem Enzymgemisch aus Helix pomatia, inkubiert. Anschließend wurden die freien Steroide mit Äther extrahiert, an Sephadex LH 20 chromatographiert und die Radioaktivität der Oestron- und Oestradiolfraktion gemessen. Dabei wurde die gesamte eingesetzte Aktivität des radioaktiv markierten Oestronsulfats in der Oestronfraktion, die gesamte eingesetzte Aktivität des radioaktiv markierten Oestradiolglucuronids in der Oestradiolfraktion gefunden. Damit ist gezeigt, daß unter unseren Reaktionsbedingungen die verwendeten Enzympräparate das Verhältnis von Oestradiol:Oestron nicht verändern.

2.3. Untersuchungen zur Optimierung der enzymatischen Hydrolyse der Oestrogenkonjugate

2.3.1. Hydrolyse der Oestrogenglucuronide- und Sulfate mit einem Enzymgemisch aus Helix pomatia

Die Hydrolyse der Oestrogenglucuronide- und Sulfate soll mit einem Enzymgemisch, bestehend aus einer β-Glucuronidase und einer Sulfatase, das aus dem Magensaft der Schnecke Helix pomatia hergestellt wird, durchgeführt werden. Um die optimalen Bedingungen für die Hydrolyse zu finden, wurden die Oestrogenkonjugate bei verschiedenen pH-Werten und verschiedener Temperatur, Inkubationszeit und Enzymkonzentration gespalten. Zur Kontrolle der Spaltung wurden zwei, am Steroidmolekül radioaktiv markierte Oestrogenkonjugate, ^{3}H-Oestronsulfat und ^{3}H-Oestradiolglucuronid, verwendet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die in jeweils 10-fachem Ansatz durchgeführt wurden, sind in Abb. 7 dargestellt. Die Streuungen der Einzelwerte sind gering. Um die Übersicht nicht zu beeinträchtigen, sind sie in den Abbildungen nicht eingezeichnet.

2.3.1.1. pH-Optimum

1 ml Urin wurde durch Zugabe von 3 ml Puffer (Natrium-Acetat-Puffer bzw. Trispuffer) auf pH-Werte von 4.0 - 9.0 eingestellt.

Nach Zugabe einer definierten Menge ^{3}H-Oestronsulfats bzw. ^{3}H-Oestradiolglucuronids wurde mit dem Enzymgemisch 24 Stunden bei 37^{0} C inkubiert. Anschließend wurden die freigesetzten Steroide mit Äther extrahiert und die Radioaktivität des Extraktes als Prozent der eingesetzten Aktivität ermittelt. Dabei ergab sich als Optimum für die Sulfatase-Aktivität ein pH-Wert von 5.8; für die ß-Glucuronidase ein pH-Optimum von 5.2 (Abb. 7 oben).

Da die beiden pH-Optima nahe beieinanderliegen, ist es gerechtfertigt, die gemeinsame Hydrolyse von Sulfaten und Glucuroniden ohne zusätzliches Umpuffern bei einem pH-Wert von 5.4 durchzuführen.

2.3.1.2. Optimale Inkubationstemperatur bei verschiedenen Enzymkonzentrationen

Die optimale Inkubationstemperatur und Enzymkonzentration wurde in Ansätzen von 1 ml Urin und 3 ml Puffer pH 5.4, denen eine definierte Menge ^{3}H-Oestradiolglucuronid hinzugefügt worden war, ermittelt. Es wurden jeweils drei verschiedene Enzymkonzentrationen geprüft. Sie betrugen für die ß-Glucuronidase 1000, 200 und 100 Fishman-Einheiten (FU) und für die Arylsulfatase 10 000, 2000 und 1000 Roy-Einheiten (Roy-U) pro ml Urin. Die Temperatur der 24-stündigen Inkubation wurde für alle Ansätze der einzelnen Enzymkonzentrationen von 10 - 80^{0} C variiert. Nach der Extraktion mit Äther wurde die Radioaktivität des Extraktes, die die freigesetzten Steroide repräsentiert, gemessen und daraus der Prozentsatz der gespaltenen Steroide ermittelt.

Das Ergebnis (Abb. 7 unten) zeigt, daß der optimale Temperaturbereich der Hydrolyse durch die verschiedenen Enzymkonzentrationen nicht beeinflußt wurde. So lag die optimale Inkubationstemperatur der 3 untersuchten Enzymkonzentrationen für die Arylsulfatase zwischen 25^{0} C und 40^{0} C und entsprechend für die ß-Glucuronidase zwischen 25^{0} C und 60^{0} C.

2.3.1.3. Optimale Inkubationszeit bei verschiedenen Enzymkonzentrationen

Die optimale Inkubationszeit bei den verschiedenen Enzymkonzen-

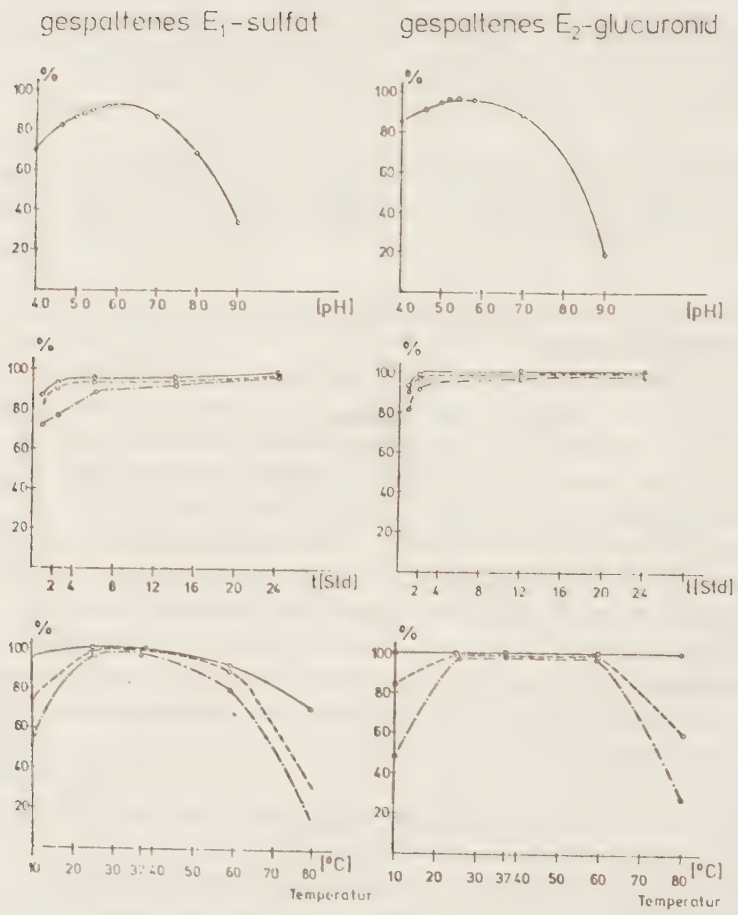


Abb. 7
Hydrolyse der Oestrogenkonjugate, Oestronsulfat und Oestradiol-glucuronid, mit β-Glucuronidase und Arylsulfatase aus Helix pomatia bei verschiedem pH, variabler Zeit und Temperatur. Die Konzentrationen der beiden Enyzme β-Glucuronidase (FU) und Arylsulfatase (Roy-U) betragen pro ml Urin: 1000 FU und 10 000 Roy-U = ——— ; 200 FU und 2000 Roy-U = - - - - - ; 100 FU und 1000 Roy-U = - • - • - • - .
E_1 = Oestron, E_2 = Oestradiol.

trationen (siehe Absatz 2.3.1.2.) wurde in Ansätzen von 1 ml Urin und 3 ml Puffer pH 5.4, die mit definierten Mengen von ^{3}H-Oestronsulfat bzw. ^{3}H-Oestradiolglucuronid versetzt worden waren, getestet. Diese Ansätze wurden bei konstanter Temperatur von 37° C mit verschieden langen Inkubationszeiten, die zwischen 1/2 Stunde und 24 Stunden lagen, inkubiert. Anschließend wurden die freigesetzten Steroide mit Äther extrahiert und die Radioaktivität des Extraktes als Prozent der eingesetzten Aktivität ermittelt.

Dieser Versuch zeigt, (Abb. 7 Mitte), daß die Inkubationszeit direkt von der Enzymkonzentration abhängt : je höher die Enzymkonzentration, desto schneller wurden die beiden Oestrogenkonjugate gespalten.

2.3.2. Hydrolyse der Oestrogenglucuronide mit einer β-Glucuronidase aus E. coli

Zur Hydrolyse der Oestrogenglucuronide soll eine bakterielle β-Glucuronidase aus E. coli verwendet werden. Die optimalen Bedingungen der Hydrolyse wurden ermittelt.

2.3.2.1. pH-Optimum

Um den optimalen pH-Bereich zu ermitteln, wurde zu 1 ml Urin und 3 ml Puffer (Natrium-Acetat-Puffer bzw. Trispuffer) von pH 4.0 - 9.0, eine definierte Menge ^{3}H-Oestradiolglucuronids, zugefügt. Die Hydrolyse wurde mit 2000 FU β-Glucuronidase bei 37° C durchgeführt. Nach der Extraktion mit Äther wurde die Aktivität des Extraktes als Prozent der eingesetzten Aktivität ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 8 dargestellt und zeigt zwischen pH 5.2 und 7 einen breiten Bereich optimaler Enzymaktivität.

2.3.2.2. Optimale Inkubationszeit

Die Abhängigkeit der Hydrolyse von der Inkubationszeit wurde in jeweils 10-fachen Ansätzen mit unterschiedlicher Inkubationsdauer bei pH 5.4 und 37° C mit 2000 FU β-Glucuronidase pro ml Urin getestet. Bereits nach 30 Minuten war die Hydrolyse vollständig (100 $\pm$ 0.5%, $\bar{x} \pm 6$).

Diese Ergebnisse zeigen, daß das verwendete Enzympräparat eine sehr hohe β-Glucuronidase Aktivität besitzt. Die Oestrogenglucuronide können bei 37° C - der Temperaturbereich der optimalen Enzymaktivität liegt zwischen 25° C und 50° C (147) - in einem relativ breiten pH-Bereich schnell und vollständig gespalten werden.

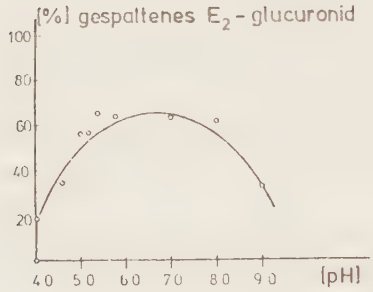


Abb.8
Hydrolyse von Oestradiolglucuronid mit einer β-Glucuronidase aus E. coli bei variablem pH

2.4. Zusammenfassende Darstellung der enzymatischen Hydrolyse

Aus den in den Vorversuchen ermittelten Ergebnissen wurde eine praktikable Methode zur Hydrolyse der Harnoestrogenkonjugate entwickelt (Tab. IV). Die pH-Optima der einzelnen Enzyme sind zwar nicht identisch, sie liegen aber doch so nah beieinander, daß für alle Enzyme derselbe Puffer von pH 5.4 verwendet werden kann. Die Inkubationszeiten und die Enzymkonzentrationen sind großzügig angegeben; die Inkubationstemperatur von 37° C liegt in einem Bereich, in dem alle drei Enzyme gleichermaßen aktiv sind.

Tabelle IV

Enzymatische Hydrolyse der Oestrogenkonjugate

Oestrogen-glucuronide	Oestrogenglucuronide und Oestrogensulfate
0.5 - 1 ml Säuglingsurin + 3 ml Natriumacetat-puffer pH 5.4	
	Vorinkubation 24 Stunden bei 37° C
2000 FU β-Glucuronidase aus E. coli /ml Urin	500 FU β-Glucuronidase und 4000 Roy-U Sulfatase aus Helix pomatia/ml Urin
Inkubation 24 Stunden bei 37° C	

2.5. Routinemäßige Durchführung der Bestimmung der verschiedenen Fraktionen von Oestron und Oestradiol im Urin

2.5.1. Vorbereitung der Urinproben

2.5.1.1. Hydrolyse und Extraktion

Von jeder Urinprobe wurden 3 verschiedene Oestrogenfraktionen bestimmt: die freien, nicht konjugierten Oestrogene, die Oestrogenglucuronide und indirekt - durch gemeinsame Bestimmung der Glucuronide und Sulfate - die Oestrogensulfate. Die Bestimmung jeder dieser Fraktionen wurde in einem getrennten Ansatz durchgeführt.

Freie Oestrogene:

5 ml Urin wurden zur Kontrolle der Ausbeute (sogenannte radioaktive Wiederfindung), mit ca. 1000 cpm radioaktiv markiertem Oestron und Oestradiol versetzt. Die freien Steroide können anschließend mit 2 x 10 ml Äther extrahiert werden.

Oestrogenglucuronide:

1 ml Urin wurde mit 3 ml Puffer pH 5.4 verdünnt und vor der Hydrolyse mit ca. 1000 cpm radioaktiv markiertem Oestron und Oestradiol versetzt. Zur Hydrolyse der Oestrogenglucuronide wurden 2000 FU ß-Glucuronidase hinzugegeben. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C wurden die freigesetzten Steroide mit 2 x 10 ml Äther extrahiert.

Oestrogenglucuronide
und Oestrogensulfate:

0.5 ml Urin und 3 ml Puffer pH 5.4 wurden vor der Hydrolyse zur Kontrolle von Verlusten mit ca. 1000 cpm radioaktiv markiertem Oestron und Oestradiol versetzt. Nach einer 24 stündigen Vorinkubation bei 37° C zur Zerstörung der Inhibitoren der ß-Glucuronidase wurden 250 FU ß-Glucuronidase und 2000 Roy-Einheiten Sulfatase aus Helix pomatia zugegeben. Zur Hydrolyse der Konjugate wurde der Ansatz 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die freigesetzten Steroide mit 2 x 10 ml Äther extrahiert.

Die weitere Aufarbeitung ist für alle Ansätze gleich. Die Ätherextrakte wurden mit aqua dest. gewaschen und anschließend in einem Wasserbad bei 37° C getrocknet.

2.5.1.2. Chromatographie

Die Reinigung und Trennung der Oestrogene erfolgte mit einer modifizierten Methode (25) nach MIKHAIL et al. (133) für die Aufarbeitung von Plasmaproben durch eine Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 mit Benzol/Methanol im Verhältnis 85/15 als Laufmittel. Die Säulen haben einen Innendurchmesser von 1 cm und sind unten mit Glasfritten versehen. 3.7 g Sephadex ergeben ein Gelbett

von ca. 14 cm Höhe. Die Fraktionen von Oestron und Oestradiol wurden mit radioaktiven Oestrogenen lokalisiert. Die trockenen Urinextrakte wurden in einer kleinen Menge des Laufmittels gelöst, auf die Säulen aufgetragen und chromatographiert. Die Oestron- und Oestradiolfraktion - 4 bzw. 5 ml - wurden getrennt aufgefangen.

Die trockenen Rückstände wurden in 250 ul Assaypuffer gelöst. 2 x 100 ul wurden für einen Doppelansatz des Radioimmunoassay weiterverwendet. Aus 25 ul wird die Ausbeute kontrolliert. Sie lag für Oestron und Oestradiol zwischen 70 und 90%. Diese sogenannte radioaktive Wiederfindung diente zur Korrektur der Endergebnisse.

2.5.2. Durchführung des Radioimmunoassay

Die Quantifizierung der Oestrogene, Oestron und Oestradiol, erfolgt mit einer radioimmunologischen Methode, die im Endokrinologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik München für die routinemäßige Bestimmung der Plasmaoestrogene im Kindesalter entwickelt worden ist (25). Die wichtigsten Punkte dieser Methode sollen hier kurz besprochen werden.

2.5.2.1. Standardkurve

Die Eichkurve wurde mit Oestron- und Oestradiol-Standardlösungen, im Bereich von 0 - 100 pg/100 ul Assaypuffer erstellt. Um die Standards möglichst ähnlich wie die Proben zu behandeln, wurde vor jeder Säulenchromatographie "oestrogenfreies" Eluat gesammelt und davon 4 bzw. 5 ml, entsprechend den Volumina der Oestron- bzw. der Oestradiolfraktion, in die Standardröhrchen pipettiert. Nach dem Abdampfen dieses Eluats wurden 250 ul der entsprechenden Standardlösung in diese Röhrchen gegeben und 2 Minuten geschüttelt. Jeweils 2 x 100 ul dieser Lösung wurden in frische Röhrchen überpipettiert und im weiteren Verlauf des Radioimmunoassay wie eine Probe behandelt.

Abbildung 9 zeigt eine Standardkurve für die Messung von Oestron. Die Streuung der Einzelwerte in 10 aufeinanderfolgenden Assays ist angegeben.

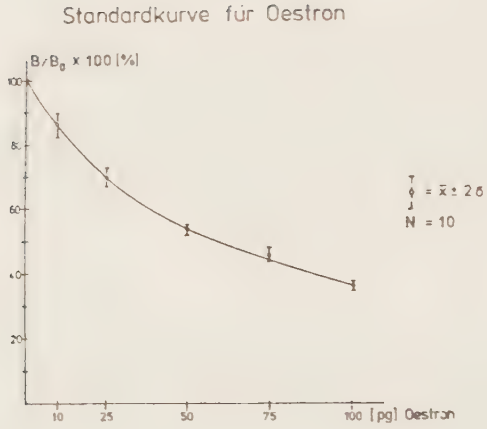


Abb. 9
Standardkurve zur Messung von Oestron. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus 10 aufeinanderfolgenden Radioimmunoassays.

2.5.2.2. Radioimmunoassay

Zu den in 100 ul Assaypuffer gelösten Oestrogenen, Oestron und Oestradiol, wurden 12 000 cpm tritiiertes Oestron bzw. Oestradiol und 500 ul Antikörperverdünnung pipettiert. Diese Ansätze wurden nach kurzem Schütteln 2 Stunden in Eiswasser inkubiert. Die Trennung der freien von den gebundenen Steroiden erfolgte durch Zugabe von 500 ul Dextran-Kohle-Gemisch in Assaypuffer. Nach einer weiteren Inkubation von 15 Minuten in Eiswasser wurden die an Kohle adsorbierten Moleküle bei 0^{o} C mit 1800 x g abzentrifugiert. Die Antikörper gebundenen Steroide bleiben im Überstand und wurden in Zählröhrchen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit dekantiert. Die Radio-

aktivität wurde bis zur Akkumulation von 20 000 cpm, entsprechend einem maximalen Zählfehler von 1.4%, gemessen.

2.5.3. Qualitätskontrolle

2.5.3.1. Präzision

Zur Prüfung des gesamten Analysenganges wurde die Reproduzierbarkeit der Oestrogenbestimmung innerhalb einer Serie und in 10 aufeinanderfolgenden Assays ermittelt. Dazu wurde der 12 Stunden Urin eines Säuglings verwendet. Die für die verschiedenen Fraktionen erhaltenen Werte sind in den Tab.V und VI aufgeführt.

Tabelle V

Reproduzierbarkeit der Oestrogenbestimmung aus Kinderurin in 10 aufeinanderfolgenden Assays

Konjugat	Oestrogen	$\bar{x}$ (ng/12h)	Standard-abweichung (ng/12h)	Variations-koeffizient (%)
Glucuronide	Oestron	6.7	0.7	10.1
	Oestradiol	6.3	1.3	19.8
Glucuronide und Sulfate	Oestron	12.5	1.8	14.7
	Oestradiol	14.2	2.1	14.8

Tabelle VI

Reproduzierbarkeit der Oestrogenbestimmung aus Kinderurin innerhalb der Serie.N = 10.

Konjugat	Oestrogen	$\bar{x}$ ng/12h	Standardabweichung (ng/12h)	Variationskoeffizient (%)
Glucuronide	Oestron	5.4	0.4	8.4
	Oestradiol	4.6	0.4	8.9
Glucuronide und Sulfate	Oestron	10.8	1.0	9.0
	Oestradiol	13.0	0.5	4.1

2.5.3.2. Richtigkeit

Einem Kontrollurin wurden in steigender Konzentration Oestronglucuronid bzw. Oestradiol-17β-3-sulfat, zugesetzt. Anschließend wurden diese Proben nach der beschriebenen Methode aufgearbeitet und die Oestrogenkonzentration gemessen. Die Korrelation von zugefügten Oestrogenkonjugaten und gemessenem Oestrogen ist in Abb. 10 dargestellt. Die Mengenangaben beziehen sich auf den Steroidanteil der Konjugate. Der endogene Oestrogenanteil wurde von den Endergebnissen abgezogen.

2.5.3.3. Empfindlichkeit

Die Meßfehler, die durch Verunreinigung der Reagenzien oder Geräte verursacht werden, wurden laufend kontrolliert. In jeder Meßreihe wurde ein Reagenzienleerwert (blank) mitgeführt und wie eine Probe behandelt. Dazu wurde eine den Probenvolumina entsprechende Menge destilliertes Wasser eingesetzt. Die auf diese Weise gemessenen blank-Werte betragen im Mittel nur 2.1 pg/ml bzw. 2.3 pg/ml und

wurden deshalb nicht von den Analysenergebnissen abgezogen.

Aus mittlerem blank-Wert plus zwei Standardabweichungen errechnet sich für die beschriebene Methode eine untere Nachweisgrenze von 1 ng Oestron bzw. Oestradiol in einem 12 Stunden Urin.

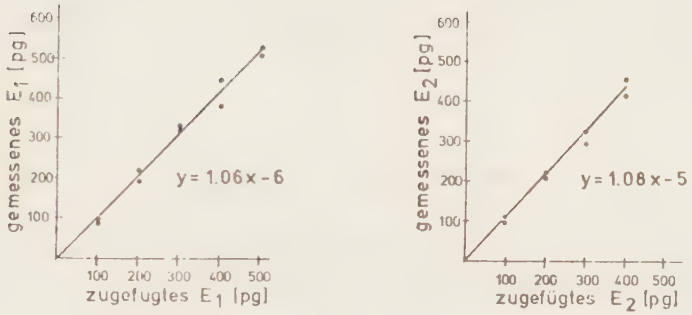


Abb. 10
Korrelation von zugefügtem Oestrogenkonjugat, Oestronglucuronid und 17β-Oestradiol-3-Sulfat, und gemessenem Oestrogen. Der endogene Oestrogenanteil wurde von dem Endergebnis abgezogen. Die Mengenangaben berücksichtigen nur den Steroidanteil E_1 = Oestron, E_2 = Oestradiol

2.5.3.4. Spezifität

Die Spezifität dieser Nachweismethode hängt in entscheidendem Maße von der Eigenschaft des verwendeten Antiserums ab. Die Kreuzreaktionen des bei den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Antikörpers mit den wichtigsten, natürlich vorkommenden Steroiden zeigt Tab. II. Oestron und Oestradiol werden etwa gleich stark gebunden. Daher muß zur getrennten Bestimmung von Oestron und Oestradiol eine chromato-

graphische Trennung der Steroide durchgeführt werden. Dabei werden gleichzeitig eventuell störende Substanzen abgetrennt.

2.5.3.5. Praktikabilität

Mit dieser Methode können von einer Person in einer Woche aus 10 Säuglingsurinen die 6 interessierenden Oestrogenfraktionen analysiert werden.

2.5.3.6. Plausibilität

Um zu prüfen, ob wir mit unserer Methode plausible Ergebnisse erhalten, untersuchten wir die Oestrogenausscheidung bei einer gesunden Frau. Dabei wurde nicht nur ein für den Cyclus typisches Muster gefunden, sondern auch eine gute Übereinstimmung mit den von BROWN (41) mit einer sehr empfindlichen fluorimetrischen Methode gemessenen Normalwerten festgestellt (Tab. VII).

Tabelle VII

Vergleich der Oestrogenausscheidung einer gesunden Frau, die mit unserer Methode gemessen wurde, mit den von BROWN (41) angegebenen Normalbereichen (Werte in Klammern)

	Oestron ug/24h Urin	Oestradiol ug/24h Urin
Minimalwert (nach der Menstruation)	6 (2 - 7)	4 (0 - 4)
Maximum zur Zeit der Ovulation	15 (11 - 31)	12 (6 - 14)
Maximum in der Lutealphase	12 (7 - 23)	9 (1 - 11)

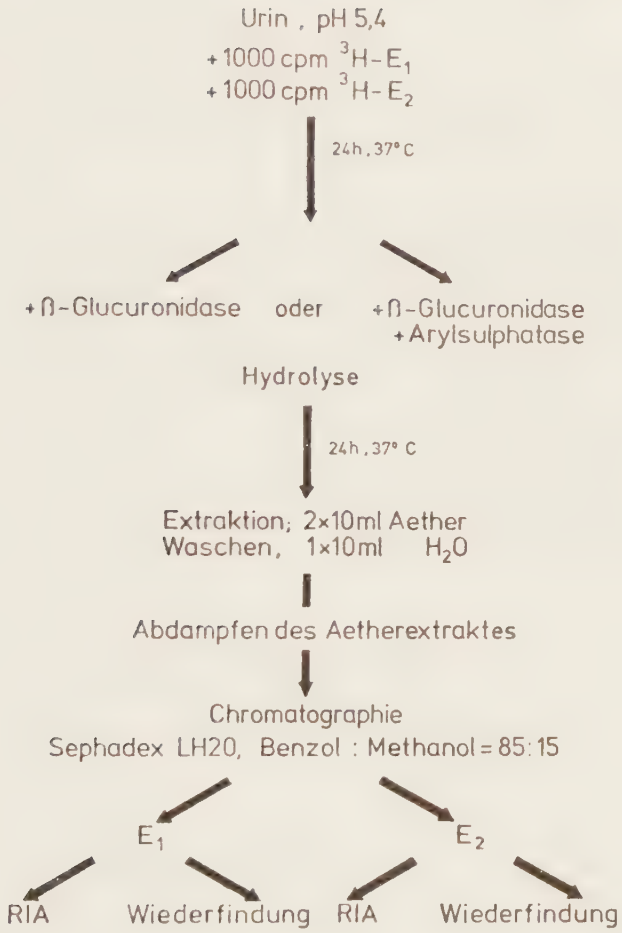


Abb. 11
Schematische Darstellung des Analysenganges zur Bestimmung von konjugiertem Oestron und Oestradiol im Urin von Säuglingen und Kleinkindern. E_1 = Oestron, E_2 = Oestradiol, RIA = Radioimmunoassay

3. ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION DER METHODE

Die bisherigen Methoden zur Bestimmung der Oestrogene im Urin waren wenig spezifisch und relativ unempfindlich. Dies erklärt, warum bis jetzt ausführliche Untersuchungen der Oestrogenausscheidung in der frühen Kindheit fehlen.

Es bot sich uns an, den im Endokrinologischen Labor der Universitätskinderklinik München entwickelten Radioimmunoassay zur Messung geringster Oestrogenkonzentrationen im Plasma (25) auch zur Bestimmung dieser Hormone im Urin zu verwenden. Wegen der völlig anderen Konzentrationen der Harnsteroide mußte eine neue Methode zur Probenvorbereitung entwickelt werden. Wichtigster zusätzlicher Schritt bei der Aufarbeitung der Proben ist die Hydrolyse der Konjugate, da die Oestrogene zum größten Teil als Sulfat- oder Glucuronsäureester ausgeschieden werden. Bei den geringen Hormonkonzentrationen der Säuglinge und Kleinkinder erwies sich die schonende, enzymatische Hydrolyse zur Spaltung der Oestrogenkonjugate als geeignet.

Zur Spaltung der Glucuronide wählten wir eine bakterielle β-Glucuronidase, die frei von jeglicher Sulfatase-Aktivität war. Damit konnten die Glucuronide rasch und vollständig gespalten werden. Dieses Präparat ist sehr preiswert, so daß es auch zur Aufarbeitung größerer Serien von Proben verwendet werden kann.

Dagegen ist die komerziell erhältliche reine Sulfatase unverhältnismäßig teuer, so daß wir uns zu einer indirekten Bestimmung der Sulfatfraktion entschlossen. Mit einem Mischpräparat aus Helix pomatia, das eine β-Glucuronidase - und eine Arylsulfatase-Aktivität aufweist, wurden Sulfate und Glucuronide gemeinsam gespalten. Aus der Differenz zwischen "Gesamtkonjugat" und Glucuronidfraktion kann die Sulfatfraktion indirekt ermittelt werden.

Diese indirekte Messung der Sulfatfraktion ist durch die guten Ergebnisse der Qualitätskontrolle, die bei der Prüfung des gesamten Analysenganges erhalten wurden, gerechtfertigt. Dabei wurden einge-

setzte Mengen von Oestrogenkonjugaten zu 100% wiedergefunden. Der intra-assay Variationskoeffizient lag zwischen 4 und 9%, der inter-assay Variationskoeffizient zwischen 10 und 18%.

Die untere Nachweisgrenze der hier beschriebenen Methode (siehe Abb. 11) liegt bei 1 ng Oestron bzw. Oestradiol in einem 12 Stunden Urin. BROWN (41) erfaßt mit seiner empfindlichsten fluorimetrischen Bestimmungsmethode jeweils 0.1 ug der drei klassischen Oestrogene in einem 24 Stunden Urin. Nur wenige Arbeitsgruppen nutzten bisher radioimmunologische Methoden zur Bestimmung der Urinoestrogene (13, 51, 99, 108). Zwar wurden empfindliche Methoden zur Messung der Urinausscheidung von Frauen nach der Menopause und bei Männern entwickelt, allerdings wurden meist nur einzelne Oestrogene oder aber nur bestimmte Oestrogenfraktionen erfaßt. So beschrieben zum Beispiel KONO et al. (108) einen Radioimmunoassay zur Messung unkonjugierter Oestrogene bei Frauen und Männern, während AOKI et al. (13) die Oestrogenglucuronide im Urin geschlechtsreifer Frauen bestimmten. Mit unserer Methode ist es jetzt möglich, die sehr geringen Konzentrationen verschiedener Oestrogenfraktionen im Urin von Säuglingen, Kleinkindern und Schulkindern vor der Pubertät exakt zu erfassen.

Die beiden verwendeten Enzympräparationen, die bakterielle Glucuronidase und die Mischpräparation aus Glucuronidase und Arylsulfatase aus Helix pomatia, weisen breite und sich überschneidende pH - und Temperaturoptima auf, so daß mit beiden Enzymen unter gleichen Bedingungen gearbeitet werden kann. Dadurch konnten aufwendige Veränderungen des Reaktionsmilieus zum Beispiel durch Umpuffern oder Umstellen der Temperatur vermieden werden.

Da die Urinvolumina so gewählt werden konnten, daß der Plasmaoestrogenradioimmunoassay selbst nicht modifiziert zu werden brauchte, können für den Radioimmunoassay von Plasma- und Urinoestrogenen dieselben Reagenzien verwendet werden. Beide Untersuchungen können von derselben Arbeitskraft ausgeführt werden.

Die enzymatische Hydrolyse der Steroidkonjugate kann durch Inhibitoren der Enzyme (116), die im Urin vorhanden sein können, gestört

werden. Auch unter unseren Bedingungen war eine - wenn auch nur schwache ß-Glucuronidase - Inhibitor Aktivität feststellbar. Sie konnte, entsprechend einem Vorschlag von HARKNESS (90), durch Stehenlassen des Urins bei 37° C zerstört werden. Eine nennenswerte Sulfatase - Inhibitor Aktivität wurde unter unseren Versuchsbedingungen nicht beobachtet. Auch in der Literatur ist die Bedeutung der Enzyminhibitoren umstritten. Nach Adlerkreutz et al. (10) ist ohne Gelfiltration überhaupt keine quantitative enzymatische Spaltung der Oestrogene möglich, während BRADLOW (31) den Enzyminhibitoren keine große Bedeutung zumißt und lediglich eine Erhöhung der Enzymkonzentration und eine Verlängerung der Inkubationszeit empfiehlt. Die von uns durchgeführten Versuche mit radioaktiv markierten Oestrogenkonjugaten zeigten, daß zumindest in unserem Untersuchungsmaterial Enzyminhibitoren kein entscheidendes Hindernis bei der Durchführung der Hydrolyse darstellen.

Durch die verschiedenen Enzympräparationen können störende Redoxreaktionen zwischen Oestron und Oestradiol katalysiert werden (153, 165). Dieser Prozeß scheint abhängig zu sein von der Reinheit der Enzympräparate und in geringem Ausmaß auch vom Reaktionsmilieu. Auch diese Störeffekte zeigten sich unter unseren Versuchsbedingungen nicht.

Während sich die genannten Störeffekte durch radioaktiv markierte Konjugate kontrollieren lassen, entzieht sich eine Fehlerquelle weitgehend der Kontrolle des Labors, nämlich das unvollständige Sammeln des Urins über einen definierten Zeitraum (87). Bei den folgenden klinischen Untersuchungen wurden Urine, die zweifelhaft waren, nicht verwendet.

4. UNTERSUCHUNGEN AN SÄUGLINGEN UND KLEINKINDERN

4.1. Untersuchungsmaterial

Es wurde die Oestrogenausscheidung im Urin von 18 Mädchen und 26 Jungen im Alter von 8 Tagen bis zu 2 Jahren untersucht. Bei 4 weiblichen und 3 männlichen Säuglingen konnten Längsschnittuntersuchungen über einen Zeitraum von bis zu 40 Tagen durchgeführt werden. Nur solche Kinder wurden ausgewählt, die nach leichteren, nicht endokrinen Erkrankungen noch in stationärer Beobachtung waren, oder solche, die nur aus sozialen Gründen in die Klinik aufgenommen waren. Alle Kinder wurden mit künstlichen Säuglingsmilchen ernährt; keines der Kinder erhielt Muttermilch, die Oestrogene enthalten könnte.

Der Urin wurde mit Urinsammelbeuteln aufgefangen. Um die Kinder möglichst wenig zu beeinträchtigen, wurden die Sammelbeutel nur während der Schlafzeit von 18 Uhr - 6 Uhr angeklebt. Die Menge des in diesem Zeitraum von 12 Stunden ausgeschiedenen Urins wurde gemessen. Ein Teil wurde bis zur Verarbeitung ohne weitere Konservierungszusätze bei -20^{0} C aufbewahrt.

4.2. Auswertung und Statistik

Die Ergebnisse wurden berechnet als Oestrogenmenge in ng/12 Stunden Urinausscheidung pro kg Körpergewicht.

Für den statistischen Vergleich der Oestrogenausscheidung beider Geschlechter und der verschiedenen Altersstufen wurde der Wilcoxon-Rang Test benützt.

Den Angaben in den Tabellen VIII und IX sind die Medianwerte sowie die Bereiche (niedrigster und höchster gemessener Oestrogenwert) zugrunde gelegt.

4.3. Glucuronidfraktion der Oestrogene

Die Glucuronidfraktion von Oestron und Oestradiol im Urin wurde getrennt von den freien und den sulfatgebundenen Oestrogenen bestimmt. In Abbildung 12 und 13 sind die individuellen Werte des als Glucuronid ausgeschiedenen Oestrons und Oestradiols in Abhängigkeit vom Alter aufgetragen. Trotz der niedrigen Werte wurde die Skala auf der Ordinate nicht gespreizt, um den Vergleich mit den Abbildungen der übrigen Fraktionen zu ermöglichen.

Bei beiden Geschlechtern ist eine geringgradig breitere Streuung der Einzelwerte während der ersten 6 Lebensmonate gegenüber später erkennbar. Geschlechtsunterschiede können bei der Ausscheidung der Oestrogenglucuronide nicht festgestellt werden. Entsprechend ergab auch die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede.

Die Medianwerte und die Bereiche für die einzelnen Altersstufen beider Geschlechter sind in den Tabellen VIII und IX zusammengestellt.

4.4. Bestimmung der Sulfatfraktion und der Glucuronidfraktion der Oestrogene

Die Sulfatfraktion von Oestron und Oestradiol wurde gemeinsam mit der Glucuronidfraktion bestimmt. Die Mengen von Oestron und Oestradiol, die als Glucuronid oder Sulfat ausgeschieden wurden, sind in Abbildung 14 und 15 wiedergegeben. Auf die zusätzliche Darstellung der Einzelwerte der Glucuronidfraktion (Abb. 12 und Abb. 13) wurde in diesen Abbildungen der besseren Übersicht wegen verzichtet; dafür wurde der Bereich, in dem Oestrogenglucuronide gemessen wurden (siehe Absatz 4.3) schraffiert dargestellt.

Die Einzelwerte der Sulfatfraktion wurden durch Subtraktion der Glucuronidfraktion von den "Gesamtkonjugaten" für Oestron und Oestradiol berechnet. Die Medianwerte und die Bereiche für die einzelnen Altersstufen sind in den Tabellen VIII und IX aufgeführt.

Abb. 12
Oestronglucuronid im Urin männlicher und weiblicher Säuglinge und Kleinkinder bis zum Ende des 2. Lebensjahres. E_1 = Oestron.

Abb. 13
Oestradiolglucuronid im Urin männlicher und weiblicher Säuglinge und Kleinkinder bis zum Ende des 2. Lebensjahres. E_2 = Oestradiol.

Betrachtet man die Ausscheidung der "Gesamtkonjugate" des Oestrons (Abb. 14) so fallen bei beiden Geschlechtern in den ersten Lebensmonaten deutlich höhere Werte auf. Die statistische Auswertung ergab eine signifikant höhere Oestronausscheidung während der ersten Lebensmonate gegenüber der übrigen Zeit ($p < 0.01$).

Die Ausscheidung der "Gesamtkonjugate" des Oestradiols (Abb. 15) ist während der ersten Lebensmonate ebenfalls deutlich erhöht. Bei den männlichen Säuglingen ist die Ausscheidung von Oestradiol und Oestron etwa gleich. So ist auch die Oestradiolausscheidung bei den Jungen während der ersten 3 Lebensmonate signifikant höher ($p < 0.01$) als in der übrigen Zeit.

Bei den weiblichen Säuglingen dauert die Periode erhöhter Oestradiolwerte länger. Die höchsten Oestradiolwerte werden zwar in den ersten 3 Monaten gefunden, doch liegen die Werte der Altersstufe von 3 bis 7 Monaten statistisch nicht signifikant niedriger. Im weiteren Verlauf jedoch nimmt die Oestradiolausscheidung deutlich ab. Die Werte der 6 bis 24 Monate alten Mädchen sind signifikant ($p < 0.001$) niedriger als in den ersten 6 Lebensmonaten.

Obwohl während der ersten 3 Monate die Oestradiolwerte der weiblichen Säuglinge deutlich über den höchsten Oestradiolwerten der männlichen Säuglinge liegen, lassen sich in dieser Altersstufe keine statistisch signifikanten Geschlechtsunterschiede erfassen. Durch den relativ raschen Abfall der Oestradiolausscheidung der männlichen Säuglinge ergeben sich nach dem 3. Lebensmonat jedoch erhebliche Unterschiede gegenüber den weiblichen Säuglingen. Der Geschlechtsunterschied der Oestradiolausscheidung in der Altersstufe vom 4. bis zum Ende des 7. Monates ist mit $p < 0.001$ statistisch hochsignifikant.

Die Oestronausscheidung verläuft bei beiden Geschlechtern gleich. Statistisch signifikante Geschlechtsunterschiede wurden in keiner Altersstufe erhalten.

Die Schwankungsbreite der Oestron - wie auch der Oestradiolaus-

Abb. [illegible]
Sulfat- und Glucuronidfraktionen des Oestrons im Urin männlicher und weiblicher Säuglinge und Kleinkinder bis zum Ende des 2. Lebensjahres. Der Bereich der Oestrogenglucuronidwerte ist schraffiert dargestellt.
E1 = Oestron

Abb. 15
Sulfat- und Glucuronidfraktionen des Oestradiols im Urin männlicher und weiblicher Säuglinge und Kleinkinder bis zum Ende des 2. Lebensjahres. Der Bereich der Oestradiolglucuronidwerte ist schraffiert dargestellt.
E_2 = Oestradiol

scheidung ist während des ersten Lebenshalbjahres bei beiden Geschlechtern groß; das Verhalten der einzelnen Säuglinge in diesem Zeitraum ist uneinheitlich. In derselben Altersstufe werden neben Spitzenwerten auch sehr niedrige Oestrogenwerte, die dicht über der Nachweisgrenze unserer Methode liegen, gemessen.

4.5. Freies Oestron und freies Oestradiol

Die Fraktion der freien Oestrogene, die als unkonjugiertes Steroid im Urin ausgeschieden wird, wurde gesondert bestimmt. Die Einzelwerte für das freie Oestron und Oestradiol sind in Abbildung 16 in Abhängigkeit vom Alter aufgetragen. Von 99 Meßwerten waren 14 Oestradiol- und 2 Oestronwerte nicht von Null unterscheidbar. Diese Werte wurden nicht in die Abbildung aufgenommen. Auch die meßbaren Werte der freien Oestrogene liegen weit unter den Konzentrationen der Konjugate. Daher wurde die Ordinate im Verhältnis 1:10 gespreizt. Wie bei den Konjugaten sind die Mengen an Oestron und Oestradiol, die unkonjugiert ausgeschieden werden, bei beiden Geschlechtern während der ersten 3 Lebensmonate signifikant höher als später ($p < 0.001$). Im deutlichen Gegensatz aber zu den Verhältnissen bei den konjugierten Oestrogenen scheiden die weiblichen wie die männlichen Säuglinge signifikant ($p < 0.001$) mehr Oestron als Oestradiol aus. Bei den weiblichen Säuglingen finden sich für das freie Oestron Spitzenwerte, die 3 bis 4 mal so hoch liegen wie die höchsten Oestradiolwerte derselben Altersstufe.

In den Tabellen VIII und IX sind die Medianwerte und Bereiche der freien Oestrogene für beide Geschlechter aufgeführt.

4.6. Verhältnis von Oestrogensulfat - zu glucuronid

Nach der Ermittlung der einzelnen Oestrogenfraktionen kann das Verhältnis von Sulfat- zu Glucuronidkonjugaten berechnet werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle X aufgeführt.

In den ersten 3 Lebensmonaten wird bei beiden Geschlechtern doppelt so viel Oestrogen mit Sulfat wie mit Glucuronat konjugiert. Dieses

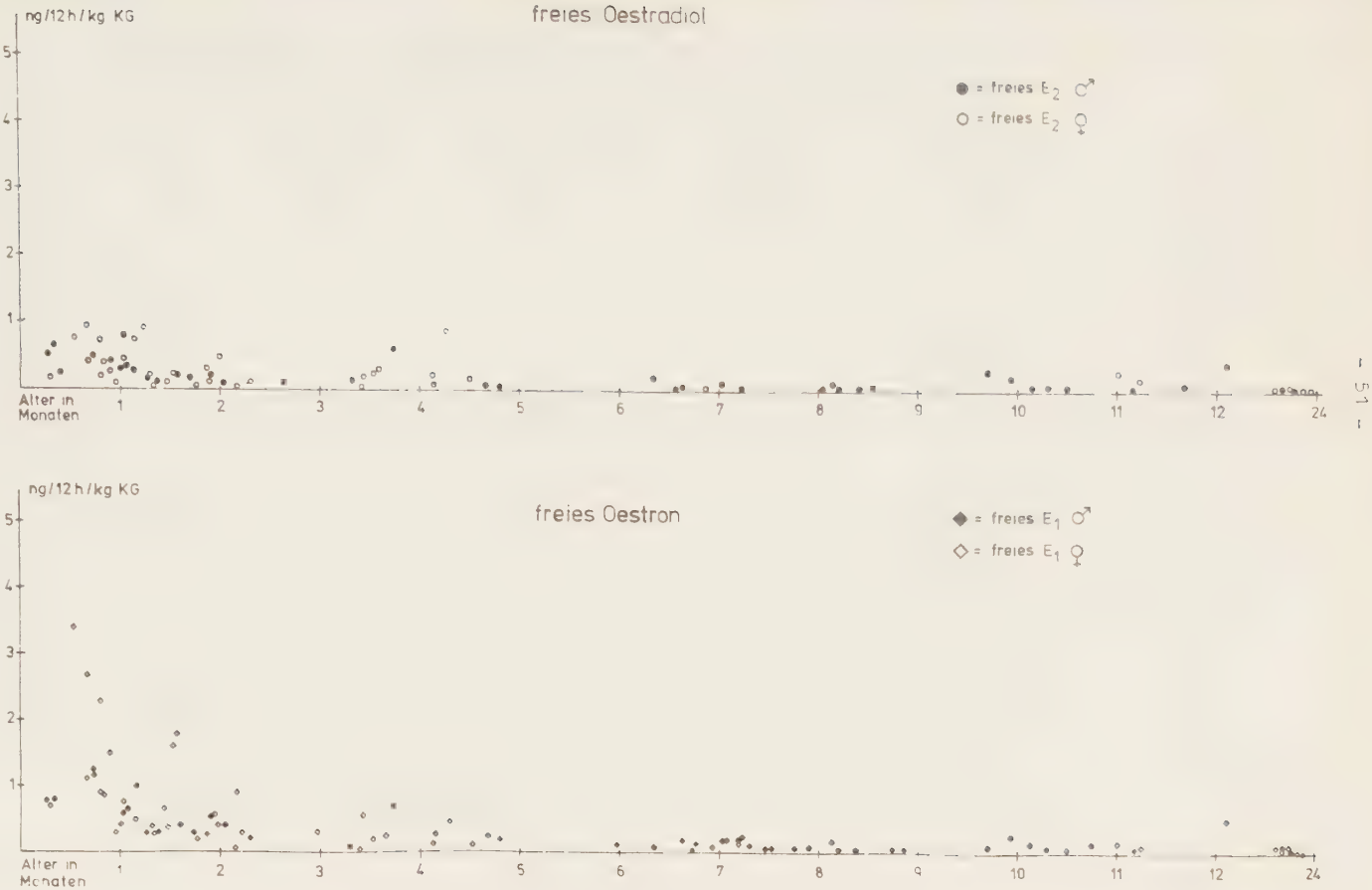


Abb. 16
Freies Oestron und freies Oestradiol im Urin männlicher und weiblicher Kinder bis zum Ende des 2. Lebensjahres. E_1 = Oestron, E_2 = Oestradiol.

Tabelle VIII

Zusammenstellung der Medianwerte (Bereiche) für die untersuchten Oestrogenfraktionen im Urin männlicher Säuglinge bis zum Ende des 2. Lebensjahres
E_1 = Oestron, E_2 = Oestradiol, ~ = Wert unterhalb der Nachweisgrenze

Alter in (Tagen)	Anzahl (n)	Freies E_1	E_1-Glucuronid	E_1-Sulfat	E_1-Glucuronid + E_1-Sulfat	
		(ng / 12 Stunden pro kg Körpergewicht)				
8- 80	17	0.5 (0.2-1.3)	1.9 (1.2-2.8)	4.2 (0.9-18.4)	6.3 (1.2-20.5)	
						> p < 0.01
81-220	13	0.2 (0.06-0.7)	0.9 (0.2-1.7)	0.2 (0 -1.1)	1.4 (0.6-3.1)	
						> NS.
221-720	22	0.1 (~ -0.5)	0.7 (0.4-1.8)	0.2 (0 -1.3)	1.1 (0.4-2.2)	

Alter in (Tagen)	Anzahl (n)	Freies E_2	E_2-Glucuronid	E_2-Sulfat	E_2-Glucuronid + E_2-Sulfat	
		(ng / 12 Stunden pro kg Körpergewicht)				
8- 80	17	0.3 (0.1-0.6)	2.5 (0.7-5.6)	4.6 (0.7-21.1)	7.6 (1.5-24.1)	
						> p < 0.01
81-220	13	0.1 (~ -0.7)	0.9 (0.3-1.7)	0.6 (0.1-1.5)	1.5 (0.6- 3.1)	
						> NS.
221-720	22	0.06 (~ -0.4)	0.7 (0.06-2.2)	0.2 (0 -1.5)	1.1 (0.4-3.6)	

Tabelle IX

Zusammenstellung der Medianwerte (Bereiche) für die untersuchten Oestrogenfraktionen im Urin weiblicher Säuglinge bis zum Ende des 2. Lebensjahres
E_1 = Oestron, E_2 = Oestradiol ~ = Wert unterhalb der Nachweisgrenze

Alter in (Tagen)	Anzahl (n)	Freies E_1	E_1-Glucuronid	E_1-Sulfat	E_1-Glucuronid + E_1-Sulfat	
		(ng / 12 Stunden pro kg Körpergewicht)				
8- 80	23	0.7 (0.1-3.5)	2.1 (0.9-5.4)	3.4 (0.5-18.5)	5.7 (1.5-23.8)	
81-220	12	0.2 (~ -0.5)	1.5 (0.7-3.1)	0.4 (0 -1.9)	2.4 (1.0- 4.7)	$p < 0.01$
221-729	11	0.05 (~ -0.2)	0.7 (0.3-1.5)	0.1 (0 -0.8)	1.0 (0.6- 2.3)	> NS.

Alter in (Tagen)	Anzahl (n)	Freies E_2	E_2-Glucuronid	E_2-Sulfat	E_2-Glucuronid + E_2-Sulfat	
		(ng / 12 Stunden pro kg Körpergewicht)				
8- 80	23	0.3 (0.04-1.0)	2.9 (1.0-6.8)	5.5 (0.9-30.0)	8.6 (1.3-37.7)	
81-220	12	0.1 (~ -0.9)	3.8 (0.7-10.2)	1.1 (0 - 8.8)	5.7 (1.1-17.8)	> NS.
221-720	11	0.05 (~ -0.3)	1.3 (0.7-2.5)	0.2 (0 - 0.8)	1.6 (0.7- 3.3)	> $p < 0.01$

Tabelle X

Zusammenstellung verschiedener Parameter der Oestrogenausscheidung männlicher und weiblicher Säuglinge und Kleinkinder bis zum Ende des 2. Lebensjahres. E_1 = Oestron, E_2 = Oestradiol, KG = Körpergewicht

Alter (Tagen)	Anzahl (n)	E_2/E_1	Sulfat: Glucuronid	Maximalwert $E_1 + E_2$ (ng/12h pro kg KG)
♀				
8- 80	23	1.5	9 : 5	61
81-220	12	2.4	3 : 10	22
221-720	12	1.6	1 : 7	6
♂				
8- 80	17	1.2	2 : 1	45
81-220	13	1.0	1 : 2	6
221-720	22	1.0	2 : 7	6

Verhältnis kehrt sich im Laufe des 1. Lebensjahres um, und am Ende des 2. Lebensjahres wird der größte Teil der Oestrogene als Glucuronid ausgeschieden. Ein Geschlechtsunterschied ist aus diesen Daten nicht ersichtlich.

4.7. Verhältnis von Oestradiol zu Oestron

Das Verhältnis von Oestradiol zu Oestron geht aus der 3. Spalte der Tabelle X hervor.

Während sich bei den männlichen Säuglingen aller Altersstufen das Verhältnis Oestradiol zu Oestron kaum von 1 unterscheidet, ist dieses Verhältnis bei den weiblichen Säuglingen immer deutlich größer als 1. Vom 3. bis zum 7. Lebensmonat ist es sogar größer als 2.

4.8. Längsschnittuntersuchungen

Bei der Bestimmung der Urinoestrogene von Säuglingen und Kleinkindern wurden in dem ersten Lebenshalbjahr neben deutlich erhöhten Oestrogenwerten auch sehr niedrige Werte gemessen.

Diese breite Streuung der Oestrogenwerte, die schon bei der Bestimmung der Oestrogene im Plasma (26) aufgefallen war, könnte durch unterschiedliche endokrine Aktivität der verschiedenen Kinder oder durch wechselnde endokrine Aktivität desselben Kindes verursacht werden. Längsschnittuntersuchungen könnten zur Klärung dieser Frage beitragen. Bei Säuglingen sind aber Längsschnittuntersuchungen der Oestrogene im Plasma wegen der benötigten großen Blutmenge nicht vertretbar. Dagegen kann der Urin von Säuglingen ohne weiteres in kürzeren Abständen gesammelt werden.

Die Ergebnisse von 7 Längsschnittuntersuchungen an 4 weiblichen und 3 männlichen Säuglingen sind in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt. Der Urin wurde in einem Abstand von durchschnittlich 4 Tagen über einen Zeitraum von 10 - 40 Tagen gesammelt.

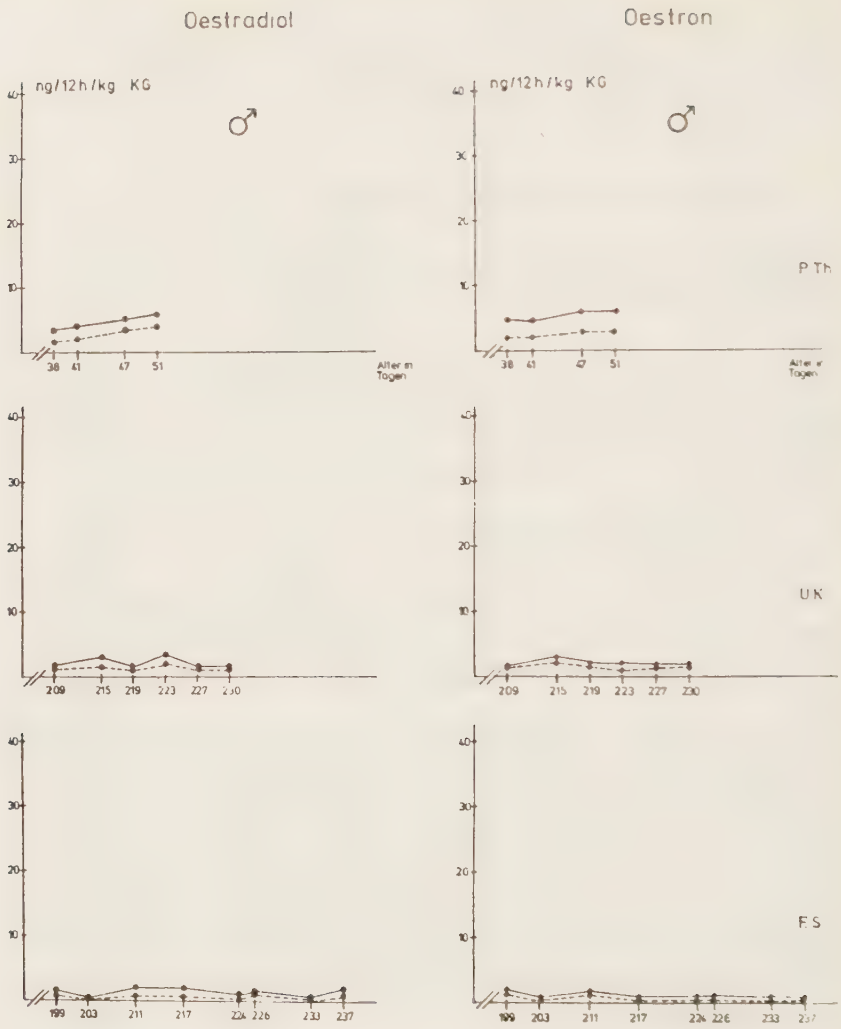


Abb. 17
Verlauf der Oestron- und Oestradiolausscheidung bei 3 männlichen Säuglingen.
Glucuronid- und Sulfatfraktionen der Oestrogene = ——— , Glucuronidfraktionen der Oestrogene = - - - - , KG = Körpergewicht.

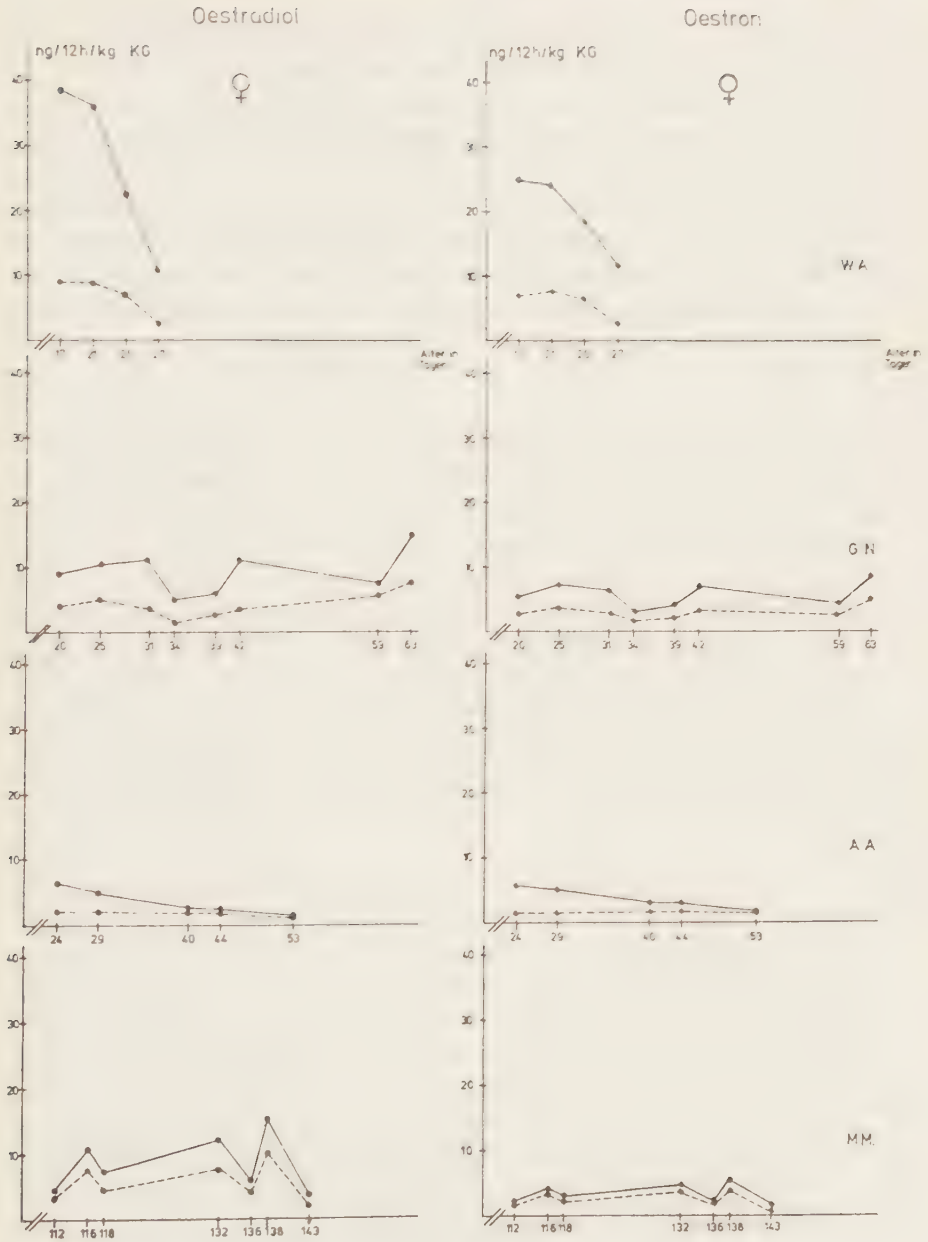


Abb. 18
Verlauf der Oestron- und Oestradiolausscheidung bei 4 weiblichen Säuglingen.
Glucuronid- und Sulfatfraktionen der Oestrogene = ——— , Glucuronidfraktionen der Oestrogene = - - - - , KG = Körpergewicht.

Der Verlauf der Oestrogenausscheidung bei den männlichen Säuglingen ist sehr gleichförmig. Bei keinem der Jungen wurden hohe Oestrogenwerte gemessen; beide Oestrogene, Oestron wie Oestradiol, zeigen nur geringe Schwankungen und werden in etwa gleich großen Mengen ausgeschieden.

Von den 4 untersuchten weiblichen Säuglingen zeigen 3 eine Oestrogenausscheidung, die starken Schwankungen mit teilweise hohen Werten unterliegt. Regelmäßige Schwankungen, etwa ein sinusförmiger Rhythmus, lassen sich hieraus nicht ableiten. Bei allen 3 Mädchen ist die Oestradiolausscheidung deutlich höher als die Oestronausscheidung.

Die Oestrogenausscheidung des Mädchens A.A. entspricht dem Verlauf der Oestrogenwerte bei den Jungen. Die Konzentration beider Oestrogene im Urin ist niedrig; die Oestron- und Oestradiolwerte unterscheiden sich kaum und bleiben nahezu konstant.

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Obwohl durch die Einführung radioimmunologischer Methoden in die Steroidanalytik (2) äußerst sensitive Methoden zur Bestimmung der Oestrogene zur Verfügung stehen,befaßten sich bisher nur wenige Untersuchungen mit der Säuglings- und Kleinkinderperiode. Bis jetzt untersuchten nur zwei Arbeitsgruppen (25, 26, 186) die Plasmaoestrogene; über die Ausscheidung der Oestrogene in dieser frühen Altersstufe gibt es nur Daten, die mit älteren, wenig spezifischen Methoden und auch nur während der ersten Lebenswoche gemessen wurden (12, 55, 84).

Dabei sind unmittelbar nach der Geburt bei beiden Geschlechtern große Mengen an Oestrogenen nachweisbar, die noch aus der Produktion der foetoplacentaren Einheit stammen (62). Ein Geschlechtsunterschied der Oestrogenkonzentration im Urin und im Plasma ist dabei nicht festzustellen. Diese erheblichen Oestrogenmengen werden rasch ausgeschieden. Bereits am 5. Lebenstag liegen die Plasmakonzentrationen von Oestron und Oestradiol im Normbereich präpubertärer Kinder (25). Ein ähnlich steiler Abfall wurde auch im Urin nachgewiesen (12, 84). Die am 5. Tag gefundenen niedrigen Werte galten lange als Normalwerte für die gesamte präpubertäre Entwicklungsphase. Dabei nahm man an, daß sich die Gonaden von der Geburt bis zur Pubertät in einer Ruhephase (169) befinden.

Die ersten Berichte, die im Gegensatz zu dieser Annahme auf eine frühe gonadale Aktivität bei Säuglingen hinweisen, stammen von FOREST et al. (80, 81). Sie berichteten, daß die Testosteronspiegel im Plasma der männlichen Säuglinge nach der Geburt ansteigen und im 3. Lebensmonat Spitzenwerte erreichen, die einem weit fortgeschrittenen Pubertätsstadium entsprechen. Danach fallen diese Werte wieder rasch ab und erreichen im Laufe des 7. Monates die für die übrige präpubertäre Kindheit typischen Werte. Die Testosteronspiegel der weiblichen Säuglinge ändern sich während dieser Zeit nicht. Dieser völlig unerwartete Geschlechtsunterschied wie auch die erstaunlich hohen Plasma-Testosteronkonzentrationen der männlichen Säuglinge wurden

inzwischen von anderen Autoren bestätigt (28, 186).

Auch im Urin werden in dieser frühen Kindheitsphase Geschlechtsunterschiede in der Testosteronkonzentration gefunden. KRAWCZYNSKA et al. (112) fanden kürzlich bei männlichen Säuglingen signifikant mehr Testosteron im Urin als bei den gleichaltrigen weiblichen Säuglingen und den älteren präpubertären Jungen (191).

Die Untersuchungen der Oestrogene im Plasma von Säuglingen und Kleinkindern, die an der Universitäts-Kinderklinik München durchgeführt worden waren, ergaben ebenfalls Hinweise für eine frühe ovarielle Aktivität bei weiblichen Säuglingen. Nach dem steilen Abfall der Oestrogenkonzentrationen während der ersten 5 Lebenstage (25, 104) steigt Oestradiol bei beiden Geschlechtern erneut an (26, 186).

Die Oestradiolspiegel der männlichen Säuglinge erreichen im Laufe des 3. Monates Spitzenwerte, die bei einigen Jungen sogar im Normbereich von Stadium 4 der männlichen Pubertät liegen. Diese hohen Oestrogenkonzentrationen fallen danach rasch wieder ab und erreichen im 6. und 7. Lebensmonat wieder niedrige Werte, die dem späteren präpubertären Normbereich entsprechen. Damit folgen die Oestradiolspiegel der Jungen dem Verlauf des Testosterons in dieser Zeit. Im Gegensatz aber zum Testosteron, das regelmäßig bei allen männlichen Säuglingen ansteigt und wieder fällt (81), zeigen die Oestradiolwerte kein einheitliches Muster. So werden in derselben Altersgruppe neben höchsten Oestradiolwerten gleichzeitig auch kaum meßbare Werte gefunden (26).

Bei den weiblichen Säuglingen ist der Anstieg der Oestradiolkonzentrationen noch ausgeprägter. Ebenfalls in der 2. Lebenswoche steigen die Oestradiolspiegel der Mädchen an und erreichen im 2. und 3. Monat Spitzenwerte, die dem Stadium 3 der weiblichen Pubertät entsprechen.

Die Streubreite der Oestradiolwerte zu diesem Zeitpunkt ist beträchtlich, so daß neben den Spitzenwerten auch kaum meßbare Oestra-

diolkonzentrationen gefunden werden.

Die Werte der weiblichen Oestradiolspiegel sind signifikant höher als bei den gleichaltrigen männlichen Säuglingen und auch signifikant höher als bei den präpubertären Mädchen nach dem 2. Lebensjahr. Der Abfall der hohen Oestrogenkonzentrationen verläuft bei den weiblichen Säuglingen sehr viel langsamer als bei den gleichaltrigen männlichen. Noch im 2. Lebensjahr werden vereinzelt erhöhte Oestradiolwerte gemessen (26).

Die Oestronspiegel im Plasma beider Geschlechter bleiben bis zur Pubertät unverändert niedrig.

Bei der Untersuchung der Ausscheidung der Oestrogene fanden wir bei beiden Geschlechtern während der ersten drei Monate signifikant mehr Oestradiol aber auch signifikant mehr Oestron als später. Bei den männlichen Säuglingen ist diese vermehrte Ausscheidung beider Hormone etwa gleich hoch. Bei den weiblichen Säuglingen unterscheiden sich zwar die Oestronkonzentrationen im Urin nicht wesentlich von denen der männlichen, die Oestradiolkonzentrationen aber erreichen bei ihnen Spitzenwerte, die weit über den höchsten Oestradiolwerten der gleichaltrigen männlichen Säuglinge liegen. Statistisch ist dieser Geschlechtsunterschied für diese Altersgruppe jedoch nicht signifikant.

Nach dem 3. Monat nehmen die ausgeschiedenen Oestrogenmengen bei beiden Geschlechtern wieder ab. Der Abfall des Oestradiols ist bei den weiblichen Säuglingen protrahierter als bei den männlichen. Noch im 7. Monat fanden wir im Urin der Mädchen signifikant mehr Oestradiol als bei den Jungen.

Deutlich wird der Geschlechtsunterschied auch beim Vergleich des Quotienten aus Oestradiol und Oestron, der bei den weiblichen Säuglingen immer größer als 1, in der Altersgruppe von 3 - 7 Monaten sogar größer al 2 ist. Bei den männlichen Säuglingen beträgt dieser Quotient immer 1. Nach WIDHOLM et al. (219) findet sich in der späteren präpubertären Phase auch bei den Mädchen ein Quotient von 1.

Da wir in der Altersstufe von 7 Monaten bis zu 2 Jahren nur wenige Mädchen untersuchen konnten, läßt sich nicht genau sagen, in welchem Alter die Oestradiolausscheidung endgültig auf präpubertäre Werte abgesunken ist. Es ist jedoch anzunehmen, daß sich die Oestradiolausscheidung auch weiterhin ähnlich verhält wie die Oestradiolspiegel des Plasmas und erst im Laufe des 2. Lebensjahres der spätere Normalbereich erreicht wird.

Auffallend bei beiden Geschlechtern ist die große Schwankungsbreite der Oestron-und Oestradiolkonzentrationen im Urin. In der Periode, in der die höchsten Werte gemessen werden, werden gleichzeitig auch Werte gefunden, die nahe der unteren Nachweisgrenze unserer Methode liegen. Ein ähnliches Verhalten war auch schon bei der Bestimmung der Oestrogene im Plasma festgestellt worden (26).

Die Oestronkonzentrationen zeigen weder im Urin noch im Plasma geschlechtsspezifische Unterschiede. Von Untersuchungen bei Erwachsenen ist bekannt, daß der größte Teil des Oestrons aus der Nebennierenrinde stammt, während Oestradiol das typische gonadale Oestrogen ist (16, 17). Das unterschiedliche Verhalten von Oestron und Oestradiol bei Säuglingen und Kleinkindern läßt vermuten, daß auch in diesem Alter beide Hormone nicht von demselben Organ stammen.

Wie eingangs schon diskutiert,könnten die hohen Plasmaoestrogenwerte auch durch eine verminderte Clearance der Oestrogene im Säuglingsalter zustande kommen. Die Tatsache aber, daß nicht nur die Oestrogenkonzentrationen des Plasmas erhöht sind, sondern daß wir auch im Urin eine stark vermehrte Ausscheidung der Oestrogene feststellen konnten, ist ein deutlicher Hinweis dafür, daß in diesem Alter tatsächlich wesentlich mehr Sexualhormone gebildet werden als in der späteren präpubertären Phase.

Es spricht einiges dafür,daß die vermehrte Oestrogenmenge in diesem Alter bereits gonadalen Ursprungs ist und durch die Stimulation der Gonaden durch hypophysäre Gonadotropine verursacht wird. Bereits 1971 konnten FAINMAN und WINIER (74) zeigen, daß erhebliche Mengen hypophysärer Gonadotropine in dieser frühen Lebensperiode vorhanden

sind. Die Gonadotropinspiegel der weiblichen wie der männlichen Säuglinge steigen kurz nach der Geburt steil an und erreichen ebenfalls im 2. und 3. Lebensmonat pubertäre und sogar Erwachsenenwerte (74, 76, 141, 159, 182, 183, 185). Dabei zeigen die hypophysären Gonadotropine LH und FSH bei beiden Geschlechtern ein unterschiedliches Verhalten. Bei den männlichen Säuglingen steigt nach der Geburt die Konzentration von LH im Plasma an und erreicht im 2. und 3. Monat Spitzenwerte, die im Bereich des erwachsenen Mannes liegen. Diese hohen Werte fallen dann bis zum 6. Lebensmonat auf die späteren präpubertären Normwerte ab. Die FSH-Spiegel folgen dem Verlauf des LH, doch ist der Anstieg des FSH bei weitem nicht so ausgeprägt. Dagegen steigen bei den weiblichen Säuglingen nach der Geburt vor allem die FSH-Spiegel steil an und erreichen im 2. Monat werte, die im oberen Normbereich der erwachsenen Frau liegen. Danach nehmen die FSH-Spiegel wieder ab; dieser Abfall erfolgt sehr langsam. Noch im 4. Lebensjahr werden vereinzelt hohe Werte gefunden (185). Die LH-Spiegel steigen auch bei den Mädchen an, doch nicht so ausgeprägt wie die FSH-Spiegel und nicht so hoch wie bei den Jungen.

Auffallend ist die große Streubreite der FSH-Spiegel weiblicher Säuglinge während der ersten Lebensmonate. Die in diesem Alter gemessenen Konzentrationen reichen von der unteren Nachweisgrenze bis in den oberen Normalbereich der erwachsenen Frau.

Eine ähnlich breite Streuung ist auch bei den Oestradiolspiegeln im Urin wie im Plasma der weiblichen Säuglinge festzustellen. Insgesamt entsprechen damit Verlauf und Verhalten des Oestradiols dem FSH in dieser Altersgruppe.

Die Produktion der Sexualhormone des heranwachsenden Mädchens unterliegt schon vor der Menarche einer cyclischen Rhythmik (27, 184). Aus Längsschnittuntersuchungen an infantilen Schimpansen berechneten FAIMAN et al. (74, 75) für das FSH einen sinusförmigen, cyclusähnlichen Rhythmus. Ein solcher Rhythmus könnte sich auch auf die infantilen Ovarien auswirken und die stark schwankenden Oestradiolspiegel der Säuglinge erklären.

Wegen des hohen Plasmabedarfes ist es nicht möglich, die Oestrogenspiegel im Plasma von Säuglingen in kurzen Abständen zu bestimmen. Weniger schwierig ist es dagegen, Urin von Säuglingen und Kleinkindern in kürzeren Abständen zu sammeln.

Die von uns bei 7 Kindern durchgeführten Längsschnittuntersuchungen zeigen erste interessante Ergebnisse. Während die Oestrogenausscheidung der männlichen Säuglinge gleichbleibend niedrig ist, zeigen 3 der 4 untersuchten Mädchen hohe Oestrogenkonzentrationen im Urin, die starken Schwankungen unterworfen sind. Ein sinusförmiger, cyclusähnlicher Rhythmus ist aber nicht erkennbar.

Aber nicht bei allen Mädchen waren hohe und fluktuierende Oestrogenwerte im Urin nachweisbar. Es ist denkbar, daß das unterschiedliche Verhalten der Oestrogene bei den einzelnen Mädchen dadurch zustande kommt, daß nicht in allen kindlichen Ovarien die Follikel bereits weit genug entwickelt sind, um auf den hypophysären Gonadotropinstimulus mit Oestrogenproduktion reagieren zu können.

Bis vor kurzem nahm man noch an, daß die hohen FSH-Spiegel der weiblichen Säuglinge auf die Unfähigkeit der infantilen Ovarien zurückzuführen sei, auf einen Gonadotropinstimulus mit Oestrogenbildung zu reagieren und dadurch die feed-back Kontrolle auf das Hypothalamus-Hypophysen System auszuüben (183). Verschiedene histologische Untersuchungen zeigten jedoch, daß das Ovar bereits in dieser frühen Kindheitsphase ein aktives Organ ist. Seine Morphologie wechselt ständig (143), wobei sich schon im Säuglingsalter regelmäßig Graaf'sche Follikel nachweisen lassen (111, 119, 129, 143, 174). Nach POLHEMUS (143) ist diese Follikelreifung am ausgeprägtesten im Alter von 4 Monaten um danach langsam wieder abzunehmen. So lassen sich die im Urin vermehrt gefundenen Oestrogene auch aus den morphologischen Befunden verstehen. Da die hohen Oestrogenkonzentrationen der männlichen Säuglinge in derselben Periode gefunden werden in der auch die Testosteronwerte und die LH-Werte hoch sind, scheint ein Zusammenhang zwischen Oestrogenkonzentrationen und früher testikulärer Aktivität zu bestehen. Die erhöhten Oestrogenwerte der männlichen Säuglinge können entweder aus direkter testikulärer Sekretion oder aus

peripherer Umwandlung des vermehrt produzierten Testosterons stammen. Die Präkursoren der Oestrogene sind in jedem Fall die männlichen Sexualhormone Androstendion und Testosteron (15). WINTER et al. (186), die kürzlich die vorübergehende Erhöhung von Oestradiol und Testosteron im Säuglingsalter bestätigten, konnten beim einzelnen Kind allerdings keine Korrelation zwischen den Konzentrationen der beiden Hormone feststellen.

Während Testosteron bei allen Jungen in den ersten Lebensmonaten anzusteigen scheint, läßt sich ein solches regelmäßiges Verhalten bei den Oestrogenen weder im Plasma noch im Urin erkennen. Untersuchungen im Erwachsenenalter (63) und während der Pubertät (25) zeigen, daß im allgemeinen eine gute Korrelation zwischen Testosteron- und Oestrogenspiegeln besteht. Die Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der Oestrogene in der frühen Lebensperiode sind noch unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die für die Oestrogenproduktion nötigen aromatisierenden Enzymsysteme erst durch Testosteron induziert werden müssen (28) und daß bei einigen Säuglingen die Phase erhöhter Testosteronspiegel hierfür nicht lange genug anhält.

Wie schon eingangs erwähnt liegen bis jetzt noch keine Daten anderer Untersucher vor, die auch nach der ersten Lebenswoche den Verlauf der Oestrogenausscheidung gemessen haben. Auch die Befunde der Oestrogenausscheidung präpubertärer Mädchen sind ebenfalls nur schwer mit unseren Ergebnis vergleichbar, da unterschiedliche Oestrogenfraktionen bestimmt wurden und das Gewicht der Kinder nicht berücksichtigt wurde (6, 41, 100, 105, 181). Eine Zusammenstellung der Oestrogenkonzentrationen präpubertärer Kinder, wie sie von den verschiedenen Autoren mit sehr unterschiedlichen Methoden bestimmt wurden, zeigt Tabelle XI.

Die biologisch aktive Form der mit dem Blut zirkulierenden Oestrogene stellen die freien, nicht an Protein gebundenen Oestrogenmoleküle dar. KONO et al. (108) nahmen an, daß die im Urin in freier, unkonjugierter Form vorhandenen Oestrogene eng mit den freien, nicht an Protein gebundenen Oestrogenen des Plasmas korrelieren.

Tabelle XI

Vergleich der Oestrogenkonzentrationen im Urin präpubertärer Kinder, die mit verschiedenen Methoden bestimmt worden waren.

	Anzahl	Oestron	Oestradiol	Gesamtoestrogene	Einheit
ADAMOPOULOS et al. (6)					
Mädchen 10 Jahre	4	0-1.5	0-3.5		ug/24h
BROWN (41)					
Mädchen 2-9 Jahre	20	0.05-0.29 0.12	0.02-0.09 0.04	0.13-0.80 0.35	ug/24h
Jungen 5-10 Jahre	18	0.07-0.32 0.16	0.02-0.07 0.05	0.22-1.03 0.53	ug/24h
KNORR et al. (105)					
Mädchen 2-6 Jahre	6	33-49	20		ng/24h
Jungen 5-9 Jahre	4	33-77	20		ng/24h
KANTERO et al. (100)					
Mädchen 8 Jahre	1			4.6	ug/24h

Wir bestimmten bei beiden Geschlechtern die Ausscheidung dieser unkonjugierten, freien Oestrogene getrennt von den Konjugaten. Dabei fanden wir während der ersten 3 Lebensmonate signifikant mehr freies Oestron und Oestradiol im Urin als im Alter von 2 Jahren. Dies steht im Einklang mit dem Verhalten der Oestrogenkonjugate. Im Gegensatz zu den Konjugaten aber liegt bei den freien, unkonjugierten Oestrogenen die Ausscheidung von Oestron signifikant höher als die von Oestradiol. Dieser Befund steht ebenfalls im Gegensatz zu dem Verhältnis von Oestron zu Oestradiol im Plasma von Säuglingen, wo Oestradiol das vorherrschende Oestrogen ist (26).

Das Überwiegen von unkonjugiertem Oestron im Urin läßt sich durch die Eigenschaften des Sexualhormon-bindenden Globulins (SHBG) im Plasma erklären. Durch dieses Transportglobulin des Plasma werden die Sexualhormone mit unterschiedlicher Affinität gebunden (127, 128, 150). Dabei ist die Bindung der Androgene am stärksten, während die Affinität zu Oestradiol nur 50% der Affinität zu Testosteron beträgt. Oestron dagegen wird nur schwach gebunden (135, 136, 177). Die Bindung an das Protein ist reversibel, sie ist aber - besonders für die biologisch aktivsten Sexualhormone (135) - so stark, daß sie die Filtrierbarkeit der proteingebundenen Hormonmoleküle verhindert (178). Da Oestron praktisch nicht an SHBG gebunden wird, muß dieses Oestrogen rascher als Oestradiol ausgeschieden werden.

Der weitaus größte Teil der Oestrogene, die wir im Urin von Säuglingen und Kleinkindern fanden, lag in konjugierter Form vor. Es ist bekannt, daß beim Erwachsenen die Oestrogene als Konjugate der Glucuron- oder Schwefelsäure ausgeschieden werden (39, 58). Der überwiegende Teil der Oestrogene wird dabei an Glucuronsäure gebunden ausgeschieden (58), während andere Konjugate, wie zum Beispiel Phosphorsäurekonjugate, nur eine unwesentliche Rolle spielen (39, 58). Dagegen fanden Untersucher, die die Foetalzeit und die ersten Tage nach der Geburt untersuchten, daß die Oestrogene, wie auch viele andere Steroide (1, 112, 130) in diesem Alter hauptsächlich mit Schwefelsäure konjugiert werden (55, 60, 61, 62, 91, 132). Die Sulfatisierung der Oestrogene wurde in den verschiedenen foetalen Geweben, besonders in der Leber und der Lunge nachgewiesen (57).

Wir fanden in den ersten Lebensjahren für das Verhältnis von Sulfaten zu Glucuroniden einen Quotienten von etwa 2. Dieses Ergebnis zeigt, daß nach der foetal- und Neugeborenenperiode die Sulfatisierung zunächst noch der bevorzugte Weg im Metabolismus der Oestrogene ist.

Auch das Testosteron der männlichen Säuglinge wird nach KRAWCZYNSKA et al. (112) in diesem Alter überwiegend als Sulfat ausgeschieden. Gleichzeitig zeigten diese Autoren, daß die bevorzugte Sulfatisierung des Testosterons nicht auf eine eingeschränkte Glucuronidierungskapazität der Leber im frühen Säuglingsalter zurückzuführen ist. Bei den von uns untersuchten Säuglingen kehrte sich im 2. Halbjahr das Verhältnis von Oestrogensulfaten zu - Glucuroniden um und am Ende des 2. Lebensjahres überwogen die Oestrogenglucuronide die Oestrogensulfate um das 4- bis 7-fache. Offensichtlich erfolgt die Umstellung des Stoffwechsels von Sulfatkonjugierung auf vorherrschende Glucuronidkonjugierung kontinuierlich im Verlauf der ersten beiden Lebensjahre.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Bestimmung geringer Konzentrationen von Oestron und Oestradiol im Urin von Säuglingen und Kleinkindern wurde eine einfache und praktikable Methode entwickelt. Wir verwendeten dazu den im endokrinologischen Labor der Universitäts-Kinderklinik München eingeführten Radioimmunoassay für Plasmaoestrogene (25) und entwickelten eine neue Methode zur Probenvorbereitung, deren wichtigster Schritt die Hydrolyse der Oestrogenkonjugate darstellt. Die unkonjugierten freien Oestrogene konnten direkt mit Äther extrahiert werden.

Besonders geeignet zur Hydrolyse der geringen Oestrogenkonzentrationen im Säuglingsurin erwies sich die schonende enzymatische Hydrolyse mit einer bakteriellen ß-Glucuronidase und einem Mischpräparat bestehend aus einer ß-Glucuronidase und einer Sulfatase aus der Schnecke Helix pomatia. Auf diese Weise konnte neben den freien unkonjugierten Oestrogenen die Glucuronid- und Sulfatfraktion von Oestron und Oestradiol im Urin bestimmt werden. Die optimalen Bedingungen der Hydrolyse mit den verschiedenen Enzympräparationen wurden mit radioaktiv markierten Oestrogenkonjugaten erarbeitet. Dabei konnte eine nahezu 100%ige Hydrolyse der Glucuronide und- Sulfate erreicht werden. Die freigesetzten Oestrogene wurden mit Äther extrahiert und anschließend mit Sephadex LH 20 (133) chromatographiert. Die getrennt aufgefangenen Fraktionen von Oestron und Oestradiol wurden radioimmunologisch gemessen. Verluste, die während der Aufarbeitung der Urinproben entstanden, wurden durch Zusatz radioaktiver Oestrogene kontrolliert und bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt.

Die untere Nachweisgrenze dieser Methode beträgt jeweils 1 ng Oestron bzw. Oestradiol in einem 12 Stunden Urin. Der gesamte Analysengang wurde nach den Kriterien der Qualitätskontrolle geprüft. Die Variationskoeffizienten für die wiederholte Bestimmung der verschiedenen Oestrogenfraktionen aus einem kindlichen Urin an 10 aufeinanderfolgenden Tagen betragen für die Fraktionen der Oestrogenglucuronide 8.4 bzw. 8.9 und 9.0 bzw. 4.1 für die gemeinsam bestimmten Oestrogenglucuronide und - Sulfate.

Mit dieser Methode wurde die Oestron- und Oestradiolausscheidung bei 18 Mädchen und 26 Jungen im Alter von 8 Tagen bis zu 2 Jahren gemessen. Bei 7 Kindern konnte die Oestrogenausscheidung über einen längeren Zeitraum verfolgt werden. Während des Untersuchungszeitraumes erhielt keines der Kinder Muttermilch.

Um die Säuglinge möglichst wenig zu beeinträchtigen, wurden die Urinsammelbeutel nur während 12 Stunden, von 18 Uhr bis 6 Uhr, angeklebt.

Die Ergebnisse wurden berechnet als Oestrogenmenge in ng/ 12 Stunden Urinausscheidung pro kg Körpergewicht. Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon-Rang Test benützt.

Bei beiden Geschlechtern ist die Oestron- und Oestradiolausscheidung im Laufe der ersten Lebensmonate signifikant höher als später. Während bei Oestron kein Geschlechtsunterschied zu erkennen ist, werden bei Oestradiol deutliche Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern sichtbar. Die männlichen Säuglinge zeigen hohe Oestron- und Oestradiolwerte während einer kurzen Zeit im Laufe der ersten beiden Lebensmonate und erreichen im 3. Monat wieder niedrige Werte. Bei den weiblichen Säuglingen sind die Spitzenwerte der Oestradiolausscheidung im Laufe des 2.Monats deutlich höher als bei den männlichen Säuglingen und auch der Abfall dieser hohen Oestradiolkonzentrationen im Urin der Mädchen verläuft langsmaer als bei den Jungen, so daß noch im 7. Monat erhöhte Werte im Urin gefunden werden. Dieser Geschlechtsunterschied ist hochsignifikant.

Vergleicht man das Verhältnis von Oestradiol zu Oestron bei weiblichen und männlichen Säuglingen, so wird hier noch einmal der Unterschied in der Oestrogenausscheidung beider Geschlechter deutlich. Während der Oestradiol/Oestron-Quotient bei männlichen Säuglingen immer 1 beträgt, ist er bei den weiblichen Säuglingen immer größer als 1, im Alter von 3 - 7 Monaten sogar größer als 2.

Die erhöhte Oestrogenausscheidung während der ersten Lebensmonate

scheint die Antwort der Gonaden auf die in diesem Alter ebenfalls erhöhten Gonadotropinspiegel zu sein. So erklären sich die bei den weiblichen Säuglingen besonders hohen Oestradiolwerte aus der Fähigkeit des unreifen Ovars, auf den Gonadotropinstimulus mit Hormonproduktion zu reagieren. Die erhöhten Oestrogene der männlichen Säuglinge sind als Stoffwechselprodukte des in dieser Altersstufe ebenfalls erhöhten Testosterons anzusehen und stellen somit ebenfalls ein Produkt der durch erhöhte Gonadotropine verursachten frühen testikulären Aktivität dar.

Die Oestrogenausscheidung der einzelnen Kinder variiert stark. So werden bei beiden Geschlechtern neben den Spitzenwerten auch kaum meßbare Konzentrationen gefunden. Verschiedene Ursachen für diese breite Streuung werden diskutiert.

Auch der Verlauf der Längsschnittuntersuchungen zeigte ein typisches geschlechtsspezifisches Muster. Während die Jungen eine gleichmäßig niedrige Oestrogenausscheidung aufweisen, ist bei den Mädchen nicht nur eine höhere Oestrogenausscheidung sondern auch die Tendenz zu stärkeren Fluktuationen zu erkennen.

Der größte Teil der Oestrogene ist als wasserlösliches Konjugat im Urin vorhanden. Die freien, unkonjugierten Oestrogene machen nur einen Bruchteil der Gesamtkonzentration aus. Während bei den Konjugaten - besonders der Mädchen - Oestradiol das vorherrschende Oestrogen ist, findet sich signifikant mehr freies Oestron als freies Oestradiol im Urin beider Geschlechter. Möglicherweise läßt sich dies durch die Existenz und die Eigenschaften des SHBG im Plasma erklären.

Im Laufe der ersten beiden Lebensjahre ändert sich das Verhältnis von Oestrogensulfaten zu Oestrogenglucuroniden entscheidend. In den ersten Lebensmonaten wird der größte Teil der Oestrogene als Sulfate ausgeschieden; am Ende des zweiten Lebensjahres dagegen hat sich dieses Verhältnis umgekehrt. Während schon beim Foeten der größte Teil der Steroide als Sulfat ausgeschieden wird, werden

beim Erwachsenen die meisten Steroide als Glucuronide ausgeschieden. Unsere Ergebnisse zeigen, daß sich während der ersten beiden Lebensjahre ein kontinuierlicher Wechsel des Oestrogenmetabolismus vom foetalen zum Erwachsenentyp vollzieht.

LITERATUR

1) AARSKOG, D.: Cortisol in the newborn infant.
Acta. Paediatr. Scand., Suppl. 158 (1965)

2) ABRAHAM, G. E.: Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17β.
Journ. Clin. Endocr. 29, 866 (1969)

3) ABRAHAM, G. E.: Solid-phase radioimmunoassay of estrogens in biological fluids. In: E. Diczfalusy (Ed.): Steroid assay by protein binding.
Acta Endocr. Suppl. 147, 332 (1970)

4) ABRAHAM, G. E.: Radioimmunoassay of steroids in biological materials.
Acta. Endocr. 75, Suppl. 183, (1974)

5) ABRAHAM, G. E.: Radioimmunologische Bestimmung von Oestradiol-17β im Plasma. In: Methoden der Hormonbestimmung. (Eds.: H. Breuer, D. Hamel, H. L. Krüskemper)
Georg Thieme Verlag Stuttgt. 1975

6) ADAMOPOULOS, D. A., LORAINE, J. A., LUNN, S. F., MACKAY, M. A., FORFAR, J. C.: Pituitary-gonadal interrelationships in pubertal female subjects.
Acta. Endocr. 76, 214 (1974)

7) ADLERKREUTZ, H., LUUKKAINEN, T.: Determination of urinary estrogens by gas chromatographie. In: Gaschromatographie of steroids in biological fluids. (Ed.: M. B. Lipsett)
New York, Plenum Press (1965)

8) ADLERKREUTZ, H.: Studies on the hydrolysis of gel-filtered urinary oestrogens.
Acta. Endocr. 57, 49 (1968)

9) ADLERKREUTZ, H., LUUKKAINEN, T.: Studies on estrogen metabolism in the adult human organism in vivo.
Adv. Biosc. 3, 53 (1969)

10) ADLERKREUTZ, H., LUUKKAINEN, T.: Methodik der Gaschromatographie und Massenspektrometrie der "neueren Oestrogene".
Z. Klin. Chem. und Klin. Biochem. 9, 421 (1971)

11) ALBRECHT, B. H., KUSALASAI, K., HAGERMAN, D. D.: Rapid enzyme hydrolysis of urine extracts for estriol analysis.
Steroids 25, 321 (1975)

12) ANDRÉN, L., BORGLIN, N. E.: Disturbed urinary excretion pattern of estrogens in newborns with congenital dislocation of the hip. I. The excretion pattern of estrogens during the first few days of life.
Acta. Endocr. 37, 423 (1961)

13) ADAMI, T., HRESHCHYSHYN, M. M.: Radioimmunoassay of urinary estrogens.
Am. J. Obstet. Gynecol. 3, 382 (1971)

14) BAIRD, D. T.: A method for the measurement of estrone and estradiol-17β in peripheral human blood and other biological fluids using 6-pipsyl-chlorids.
Journ. Clin. Endocr. 28, 244 (1968)

15) BAIRD, D. T., HORTON, R., LONGCOPE, C., TAIT, J. T.: Steroid dynamics under steady state conditions.
Rec. Progr. Horm. Res. 25, 611 (1969)

16) BAIRD, D. T., SUE-ARK, A.: Concentration of unconjugated estrone and estradiol in peripheral plasma in non pregnant women during the menstrual cycle, castrated and post-menopausal women and in men.
Journ. Clin. Endocr. 29, 149 (1969)

17) BAIRD, D. T., UNO, A., MELBY, J. D.: Adrenal secretion of androgens and oestrogens.
Journ. Clin. Endocr. 45, 135 (1969)

18) BALL, P., GELBKE, H. P., KNUPPEN, R.: The excretion of 2-hydroxyestrone during the menstrual cycle.
Journ. Clin. Endocr. 40, 406 (1975)

19) BARR, M., DICZFALUSY, E., TILLINGER, M. G.: Studies on oestrogen metabolism in infants and children.
Acta. Endocr. 37, 241 (1961)

20) BAULD, W. S.: Some errors in the colorimetric estimation of oestriol, oestrone and oestradiol by the Kober-reaction.
Biochem. J. 56, 426 (1954)

21) BAULD, W. S.: A method for the determination of oestriol, oestrone and oestradiol-17β.
Biochem. J. 63, 488 (1956)

22) BEER, D. T., GALLAGHER, T. F.: Excretion of estrogen metabolites by humans: the fate of small dosis of oestrone and oestradiol-17β.
J. Biol. Chem. 214, 335 (1955)

23) BELING, C. G.: Gel-filtration of conjugated urinary oestrogens and its application in clinical assay.
Acta. Endocr. Suppl. 79 (1963)

24) BERSON, S. A., YALOW, R. S.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.
Nature, 184, 1648 (1959)

25) BIDLINGMAIER, F., WAGNER-BARNACK, M., BUTENANDT, O., KNORR, D.: Plasma oestrogens in childhood and puberty under physiologic and pathologic conditions.
Pediat. Res. 7, 901 (1973)

26) BIDLINGMAIER, F., VERSMOLD, H., KNORR, D.: Plasma oestrogens in newborns and infants. In: M. G. Forest, J. Bertrand (Eds.): Endocrinologie sexuelle de la période périnatale. S. 299. Editions I.N.S.E.R.M., Paris, 1974

27) BIDLINGMAIER, F.: Plasmaoestrogene in Kindheit und Pubertät. Der Kinderarzt 8, 305 (1977)

28) BIDLINGMAIER, F., KNORR, D.: Oestrogens - Physiological and clinical aspects. Vol. 4 der Reihe: Pediatric and adolescent endocrinology. (Z. Laron ed.) S. Karger, Basel 1978

29) BLUNCK, W.: Die -ketolischen Cortisol- und Corticosteron-metaboliten sowie die 11-Oxy und 11-Desoxy-17-Ketosteroide im Urin von Kindern. Acta. Endocr. (Suppl.) 134, 1968

30) BRADLOW, H. L.: Extraction of steroid conjugates with a neutral resin. Steroids 11,265 (1968)

31) BRADLOW, H. L.: The hydrolysis of steroid conjugates. In: Chemical and biological aspects of steroid conjugation. (S. Bernstein, S. Solomon, eds.) Springer Verlag 1970

32) BREUER, H.: Beitrag zur Chromatographie von Oestrogenen. Naturwissenschaften 42, 16 (1955)

33) BREUER, H.: Metabolism of the natural estrogens. Vitam. Horm. 20, 285 (1962)

34) BREUER, H., BREUER, J., DAHM, K., KNUPPEN, R., LEHMANN, D.: Some newer aspects of oestrogen metabolism. Adv. Biosc. 2, 113 (1968)

35) BROWN, C. H., SAFFAN, B. D., PREEDY, J. R. K., GA, A.: Renal handling of estrogens in late pregnancy. J. Clin. Invest. 39, 975 (1960)

36) BROWN, J. B.: A chemical method for the determination of oestriol, oestrone and oestradiol in human urine. Biochem. J. 60, 185 (1955)

37) BROWN, J. B., BULBROOK, R. D., GREENWOOD, F. C.: An additional purification step for a method for estimating oestriol, oestrone and oestradiol-17β in human urine. J. Endocr. 16, 49 (1957)

38) BROWN, J. B., BLAIR, H. A. F.: The hydrolysis of conjugated oestrone, oestradiol-17β and oestriol in human urine. J. Endocr. 17, 411 (1958)

39) BROWN, J. B.: Oestrogens in the human female. In: Modern trends in human reproductive physiology - 1. (H. M. Carey ed.) Butterworths, London 1963

40) BROWN, J. B., MACNAUGHTAN, C., SMITH, M., SMYTH, A. B.: Further observations on the Kober-colour and Ittrich fluorescence reactions in the measurement of oestrone, oestradiol and oestriol. J. Endocr. 40, 175 (1968)

41) BROWN, J. B.: Spektrophotometrische und fluorimetrische Bestimmung von Oestrogenen im Urin. In: Methoden der Hormonbestimmung (H. Breuer, D. Hamel, H. L. Krüskemper eds.) Georg Thieme Verlag, Stuttgrt.1975

42) BUEHLER, H. J., KATZMAN, P. A., DOISY, P. P. DOISY, E. A.: Hydrolysis of conjugated steroids by bacterial glucuronidase. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 72, 297 (1949)

43) BUEHLER, H. J., KATZMAN, P. A., DOISY, E. A.: Hydrolysis of conjugates of neutral ketosteroids. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 78, 3 (1951)

44) BUGGE, S., NILSEN, M., METCALFE-GIBSON, A., HOBKIRK, R.: Hydrolysis of conjugated estrogen-fractions in pregnancy urine. Canad. J. Biochem. Physiol. 39, 1501 (1961)

45) BULBROOK, R. D., GREENWOOD, F. C., SNAITH, A. H.: Hormone excretion in precocious puberty in girls. Arch. Dis. Childh. 33, 295 (1958)

46) BURSTEIN, S., LIEBERMAN, S.: Hydrolysis of ketosteroid hydrogen sulfates by solvolysis procedures. J. Biol. Chem. 233, 331 (1958)

47) BUSH, I. E.: Methods of paper chromatography of steroids applicable to the study of steroids in mammalian blood and tissues. Biochem. J. 50, 370 (1952)

48) BUSH, I. E.: Chromatographie of steroid conjugates. Biochem. J. 67, 23P (1957)

49) BUSH, I. E.: Adrenocortical hyperfunction with sudden onset of hirsutism. J. Endocr. 18, 1 (1958)

50) BUTENANDT, A., HOFSTETTER, H.: Über Oestronsulfat, ein physiologisches Ausscheidungsprodukt des Follikelhormons. Z. Physiol. Chem. 259, 222 (1933)

51) CASTANIER, M., GRENIER, J., SCHOLLER, R.: A direct radioimmunoassay for an estrone and estradiol-17ß fraction in human urine. J. Ster. Biochem. 3, 305 (1972)

52) COHEN, S. L., MARRIAN, G. F.: The application of the Kober test to the quantitative estimation of oestrone and oestriol in human pregnancy urine.
Biochem. J. 28, 1603 (1934)

53) COHEN, S. L., ONESON, I. B.: The conjugated steroids. IV. The hydrolysis of ketosteroid sulfates.
J. Biol. Chem. 204, 245 (1953)

54a) COHEN, S. L.: A method for the rapid colorimetric assay of total estrins in pregnancy urine.
Journ. Clin. Endocr. 26, 994 (1966)

54b) COHEN, S. L.: Removal of substances interfering with the rapid assay of estrogen in pregnancy urine.
Journ. Clin. Endocr. 29, 47 (1969)

55) DICZFALUSY, E., TILLINGER, K. G., WESTMAN, A.: Studies on oestrogen metabolism in new-born boys.
Acta. Endocr. 26, 303 (1957)

56) DICZFALYSY, E.: Chemical determination of oestrogens in the urine.
Acta. Endocr. 31, 11 (1957)

57) DICZFALUSY, E., CASSMER, O., ALONSO, C., DE MIQUEL, M.: Estrogen metabolism in the human fetus and newborn.
Rec. Prog. Horm. Res. 17, 147 (1961)

58) DICZFALUSY, E., LAURITZEN, C.: Oestrogene beim Menschen.
Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg 1961

59) DICZFALUSY, E., CASSMER, O., ALONSO, C., DE MIQUEL, M.: Oestrogen metabolism in the human fetus. I. Tissue levels following the administration of 17β-oestradiol and oestriol.
Acta. Endocr. 37, 353 (1961)

60) DICZFALUSY, E., CASSMER, O., ALONSO, C., DE MIQUEL, M., WESTIN, B.: Oestrogen metabolism in the human fetus. II. Oestrogen conjugates by fetal organs in vitro and in vivo.
Acta. Endocr. 37, 516 (1961)

61) DICZFALUSY, E., CASSMER, O., ALONSO, C., DE MIQUEL, M.: Oestrogen metabolism in the human fetus. III. Nature of conjugated oestrogen formed by the fetus.
Acta. Endocr. 38, 31 (1961)

62) DICZFALUSY, E.: Steroid metabolism in pregnancy and in the feto-placental unit. In: Hormonal steroids (L. Martini, F. Frascini, M. Motta eds.) 1967

63) DOERR, P., PIRKE, M. M.: Regulation of plasma oestrogens in normal adult males. I. Response of oestradiol, oestrone and testosterone to HCG and fluoxymesterone administered.
Acta. Endocr. 75, 617 (1974)

64) DOGSON, K. S., SPENCER, B.: Biological chemistry: Sulphatases.
Ann. Rep. on the Progr. of Chem. Vol LIII 1956

65) DORFMANN, R. I., UNGAR, F.: Metabolism of steroid hormones.
Academic Press, New York - London 1965

66) DUFAU, M. L., DULMANIS, A., CATT, K. J., HUDSON, B.: Measurement of plasma oestradiol-17β by competitive binding assay employing pregnancy plasma.
Journ. Clin. Endocr. 30, 351 (1970)

67) EDWARDS, R. W. H., KELLIE, A. E., WADE, A. P.: The extraction and oxidation of urinary steroid conjugates.
Mem. Soc. Endocrinol. 2, 53 (1953)

68) EIK-NES, K. B., AAKVAAG, A., GROTA, L. J.: In: Gas chromatography of steroids in biological fluids (M. B. Lipsett ed.)
Plenum Press, New York 1965

69) EIK-NES, K. B., HORNING, E. C.: Gas phase chromatography of Steroids.
Springer, New York 1968

70) EMMENS, C. W.: Estrogens. In: Methods in hormone research.
(R. I. Dorfman ed.)
Academic Press, New York - London 1962

71) ENGEL, L. L.: The chemical estimation of steroid hormone metabolites.
Rec. Progr. Horm. Res. 5, 335 (1950)

72) ENGEL, L. L., SLAUNWHITE, W. R. Jr., CARTER, P., NATHANSON, I.T.: The separation of natural estrogens by countercurrent distribution.
J. Biol. Chem. 185, 255 (1950)

73) ERLANGER, B. F., BOREK, F., BEISER, S. M., LIEBERMANN, S.: Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone.
J. Biol. Chem. 228, 713 (1958)

74) FAIMAN, C., WINTER, J. S. D.: Sex difference in gonadotropine concentrations in infancy.
Nature 232, 130 (1971)

75) FAIMAN, C., WINTER, J. S. D., CHEBIB, F. S., BUTLER, T. M.: Sex difference in gonadotropins in the infant chimpanzee.
Journ. Clin. Endocr. 34, 601 (1972)

76) FAIMAN, C., REYES, F. I., WINTER, J. S. D.: Serum gonadotropin patterns during the perinatale period in man and in the chimpanzee. In: M. G. Forest, J. Bertrand ed. Endocrinologie sexuelle de la période périnatale S. 281. Editions I.N.S.E.R.M., Vol. 32, Paris 1974

77) FISHMAN, J.: Role of 2-hydroxyestrone in estrogen metabolism. Journ. Clin. Endocr. 23, 207 (1963)

78) FISHMAN, J., HELLMAN, L., ZUMOFF, B., GALLAGHER, T. F.: Effect of thyroid on hydroxylation of estrogen in man. Journ. Clin. Endocr. 25, 365 (1965)

79) FISHMAN, W. H.: Studies on B-glucuronidase. II. Factors controlling the initial velocity of hydrolysis of some conjugated glucuronides. J. Biol. Chem. 131, 225 (1939)

80) FOREST, M. G., CATHIARD, A. M., BERTRAND, J. A.: Total and unbound testosterone levels in the newborn and in normal and hypogonadal children: use of a sensitive radioimmunoassay for testosterone. Journ. Clin. Endocr. 36, 1132 (1973)

81) FOREST, M. G., CATHIARD, A. M., BERTRAND, J. A.: Evidence of testicular activity in early infancy. Journ. Clin. Endocr. 37, 148 (1973)

82) FROMAGEOT, C.: Sulfatases. In: The enzymes. (J. B. Summer, K. Myrbäck eds.) Vol. 1, Part 1 Academic Press, New York 1950

83) GALLAGHER, T. F., KRAYCHY, S., FISHMAN, J., BROWN, J. B., MARRIAN, G. F.: A comparison of methods for the analysis of estrone, estradiol and estriol in extracts of human urine. J. Biol. Chem. 233, 1093 (1958)

84) GANS, B., THOMPSON, J. C.: Neonatal oestrogen excretion and its relation to postnatal weight loss. Proc. Roy. Soc. Med. 50, 929 (1957)

85) GELBKE, H. P., KRETH, M., KUMPEN, R.: A chemical method for the quantitative determination of 2-hydroxyestrone in human urine. Steroids 21, 665 (1973)

86) GELBKE, H. P., HOOGAN, H., KNUPPEN, R.: Indentification of 2-hydroxyoestradiol and the pattern of catechol oestrogens in human pregnancy urine. J. Steroid. Biochem. 6, 1187 (1975)

87) GLEICHSPACH, H.: Zur Problematik des Harnsammelns und Konservierens bei der gaschromatographischen Steroidbestimmung. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 7, 379 (1969)

88) GRANT, G. A., BEALL, D.: Studies on estrogen conjugates. Rec. Progr. Horm. Res. 5, 307 (1950)

89) HAGERMAN, D. D., ISAACSON, K.: Comparison of ammonium sulfate precipitation and resin absorption methods for routine measurements of total urinary estrogens in pregnancy. Gynecol. Invest. 3, 195 (1972)

90) HARKNESS, R. A.: zit. nach 29

91) HAYNES, R. C., MIKHAIL, G., PRIKSSON, G., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Oestradiol metabolism in the previable human fetus and in the feto-placental unit. Acta. Endocr. 45, 297 (1964)

92) HENRY, R., THEVENET, M.: Action du suc digestif d' Helix pomatia sur les différentes stéroides conjugués urinaires. Bull. Soc. Chim. Biol. 34, 886 (1952)

93) ICHII et al.: zit. nach: Loraine, J. A. and Bell, E. T.: Hormone assays and their clinical application. Livingstone, Edinburgh - London 1971

94) ITTRICH, G.: Eine neue Methode zur chemischen Bestimmung der oestrogenen Hormone im Harn. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 312, 1 (1958)

95) JACOBSON, G. M., LIEBERMANN, S.: Studies on the chemical cleavage of the urinary glucuronides of the 17-ketosteroids. J. Bio. Chem. 237, 1469 (1962)

96) JARRIGE, P., HENRY, R.: Étude de l'activité glucuronidasique du suc digestif d'Helix Pomatia et de sa phénolsulfatase. Bull. Soc. Chim. Biol. 34, 872 (1952)

97) JAYLE, M. F., BAULIEU, E. E.: Données expérimentales sur l'hydrolyse des 17-cétostéroides conjugués urinaires par les diastases du suc digestif d'Helix Pomatia. Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 1391 (1954)

98) JAYLE, M. F.: Analyse des steroides hormonaux. Tome I.: Méthodes générales. Masson et. Co. Paris 1961

99) KALLNER, A., LANTTO, O.: Determination of urinary estriol by radioimmunoassay. Modification of a commercial kit for serum analyses. Clin. Chim. Acta, 79, 325 (1977)

100) KANTERO, R. L., WIDE, L., WIDHOLM, O.: Serum growth hormone and gonadotropins and urinary steroids in adolescent girls. Acta. Endocr. 78, 11 (1975)

101) KAIZMAN, P. A., ISRAEL, R. F., BUCHER, N. J., DOISY, E. A.: Hydrolysis of conjugated estrogens. Rec. Progr. Horm. Res. 9, 45 (1974)

102) KELCH, R. P., WEINSTEIN, R. L., JENNER, M. R., KAPLAN, S. L., GRUMBACH, M. M.: Estrone secretion by human, simian and canine testes: effect of HCG in estrone and estradiol. IV. Intern. Congr. Endocrinol., Washington June 1972, Abstract No. 542

103) KENNY, F. M., MALVAUX, P., MIGEON, C.: Cortisol production rate in newborn babies, older infants and children. Pediatrics 31, 360 (1963)

104) KENNY, F. M., ANGSUSINGHA, K., STINSON, D., HOTCHKISS, J.: Unconjugated estrogens in the perinatal period. Pediat. Res. 7, 826 (1973)

105) KNORR, D.,KIRSCHNER, M. A., TAYLOR, I. A.: Estimation of estrone and estradiol in low level urines using electron-capture gas-liquid chromatography. Journ. Clin. Endocr. 31, 409 (1970)

106) KNORR, D.: Ultrareine Glasgeräte durch Ausheizen bei 500° C. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 9, 175 (1971)

107) KOBER, S.: Eine kolorimetrische Bestimmung des Brunsthormons (Menformon). Biochem. Z. 239, 209 (1931)

108) KUNO, S., LORIAUX, D. L., LIPSETT, M. B.: A radioimmunoassay of unconjugated oestradiol in urine. Acta. Endocr. 76, 741 (1974)

109) KORENMAN, S. G., PERRIN, L. E., MCCALLUM, T. P.: A radioligand binding assay system for estradiol measurements in human plasma. Journ. Clin. Endocr. 29, 879 (1969)

110) KORNEL, L.: Studies on steroid conjugates: Evaluation of various extraction methods for the urinary conjugated cortico-steroids. Journ. Clin. Endocr. 23, 1192 (1963)

111) KRAUS, F. F., NEUBECKER, R. D.: Luteinization of ovarian theca in infants and children. Amer. J. Clin. Path. 37, 389 (1962)

112) KRAWCZYNSKA, H., ZACHMANN, M., PRADER, A.: Urinary testosterone glucuronide and sulphate in newborns and young infants. Acta. Endocr. 82, 842 (1976)

113) KUSHINSKY, S., DEMETRIN, J. A., NASUTAVICUS, W., WU, J.: Separation of mixtures of oestrogens in urinary extracts using gradient elution chromatography. Nature 182, 874 (1958)

114) KUSHINSKY, S., OTTERNESS, I.: Conjugated estrogens. IV. Separation of urinary estrogens by gel-filtration and the effect of endogenous inhibitor on the rate and extent of hydrolysis by B-glucuronidase. Steroids 3, 311 (1964)

115) LEVITZ, M., LONDON, G. P., DANCIS, J.: The interconversion of estrone and estradiol in the perfused human placenta. Endocrinology 58, 376 (1956)

116) LEVVY, G. A.: The preparation and properties of B-glucuronidase. 4. Inhibition by sugar and their lactones. Biochem. 52, 465 (1952)

117) LIEBERMANN, S., DOBRINER, K.: Steroid excretion in health and disease. I. Chemical aspects. Rec. Progr. Horm. Res. 3, 71 (1948)

118) LIEBERMANN, S., ERLANGER, B. F., BEISER, S. M., AGATE, F. J.: Steroid-protein conjugates: their chemical, immunological and endocrinological properties. Rec. Progr. Horm. Res. 15, 165 (1959)

119) LINTERN-MOORE, S., PETERS, H., MOORE, G. P. M., FABER, M.: Follicular development in the infant human ovary. J. Reprod. Fert. 39, 53 (1974)

120) LISBOA, B. P., DICZFALUSY, E.: Separation and characterisation of steroid oestrogens by means of thin-layer chromatography. Acta. Endocr. 40, 60 (1962)

121) LLOYD, C. W.: The ovaries. In: Textbook of endocrinology. (R. H. Williams ed.) W. B. Saunders, Philadelphia - London - Toronto 1968

122) MARRIAN, G. F.: Recent advances in the chemistry and biological assay of oestrin. Physiol. Rev. 13, 185 (1933)

123) MARRIAN, G. F., BAULD, W. S.: The hydrolysis of the conjugated oestrogens in human urine. Acta. Endocr. 7, 240 (1951)

124) MATSUMOTO, K., OKANO, K., UOZUMI, T., SEKI, T.: Analysis of steroids in human urine by elution chromatography on cation-exchange resins with special reference to urinary steroids of newborns. In: Steroid dynamics (N. Pinkus ed.) Academic Press, New York 1966

125) MATSUMOTO, K., SEKI, T.: A chemical method for the quantitative determination of estriol, 16-epi-estriol, estradiol-17β and estrone in human male and non-pregnancy urine.
Endocrinol. Japon. 10, 183 (1963)

126) MAYES, D., NUGENT, C. A.: Plasma estradiol determined with a competitive protein binding method.
Steroids 15, 189 (1970)

127) MERCIER, C., ALFSEN, A., BAULIEU, E. E.: A testosterone binding globulin.
Excerpta med. International Congress Series 101, 212 (1966)

128) MERCIER-BODARD, C., ALFSEN, A., BAULIEU, E. E.: Sex steroid binding plasma protein (SBP). In: E. Diczfalusy ed. : Steroid assay by protein binding.
Acta. Endocr. 64, Suppl. 147, 204 (1970)

129) MERRIL, J. A.: The morphology of prepubertal ovary.
South. Med. J. 56, 225 (1963)

130) MIGEON, C. J.: Cortisol production and metabolism in the neonate.
J. Pediatr. 55, 280 (1959)

131) MIKHAIL, G., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Oestriol metabolism in the previable human foetus.
Acta. Endocr. 42, 519 (1963)

132) MIKHAIL, G., WIQVIST, N., DICZFALUSY, E.: Oestriol metabolism in the human foeto-placental unit.
Acta. Endocr. 43, 213 (1963)

133) MIKHAIL, G., WU, C., FERRIN, M., VANDE WIELE, R. L.: Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol.
Steroids 15, 333 (1970)

134) MOORE, J. W.: A rapid method for the analysis of hydrolysable 11-deoxy-17-oxo-steroids in urine.
Clin. Chim. Acta 39, 532 (1972)

135) MURPHY, B. E. P.: Protein binding and the assay of non-antigenic hormones.
Rec. Prog. Horm. Res. 25, 536 (1969)

136) MURPHY, B. E. P.: Further studies of the specifity of the sex-hormone-binding globulin of human plasma.
Steroids 16, 791 (1970

137) NIESCHLAG, E., WICKINGER, E. J.: A review of radioimmunoassay for steroids.
Z. Klin. Chem. Klin.Biochem. 13, 261 (1975)

138) OERTEL, G. W., EIK-NES, K. B.: Dehydroepiandrosterone in blood. II. Isolation of complexes from human blood plasma containing dehydroepiandrosterone and phosphoric acid. Acta. Endocr. 30, 93 (1959)

139) OKERHOLM, R. A., CHATTORAY, S. C., PINKUS, J. L., CHARLES, D., WOTIZ, H. H.: Quantitative extraction of steroid conjugates from urine by use of a liquid-liquid partition system. Steroids 16, 66 (1970)

140) OSAWA, J., SLAUNWHITE, W. R.: Studies on phenolic steroids in human subjects. XIII. A rapid assay of urinary estrogen conjugates in pregnancy. Steroids 15, 78 (1970)

141) PENNY, R., GLAMBIWONNU, N. O., FRASIER, S. D.: Serum gonadotropin concentration during the first few years of life. Journ. Clin. Endocr. 38, 320 (1974)

142) PFANNENSTIEL, P.: Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen. Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach-Steinberg (1976)

143) POLHEMUS, D. W.: Ovarian maturation and cyst formation in children. Pediatrics, 11, 588 (1953)

144) PREEDY, J. R. K.,AITKEN, E. H.: The determination of estrone, estradiol-17β and estriol in urine and plasma with column partition chromatography. J. Biol. Chem. 236, 1300 (1961)

145) PREEDY, J. R. K., AITKEN, E. H.: Column partition chromatography of estrone, estradiol-17β and estriol in phenolic extracts of urine: fluorescence characteristics of interfering material. J. Biol. Chem. 236, 1297 (1961)

146) Produktinformation Diagnostica, Institut Pasteur-Production Fresenius, Bad Homburg 1976

148) RATNASOPA, V., SCHINDLER, A. E., LEE, T. Y., HERRMANN, W. L.: Measurement of estriol in plasma by gas-liquid chromatography. Its significance in the treatment of high-risk pregnancies. Am. J. Obstet. Gyn. 39, 295 (1967)

149) RICHARDSON, G. S.: Ovarian physiology. New Engl. J. Med. 274, 1121 (1966)

150) ROSENBAUM, W., CHRISTY, N. P., KELLY, W. G.: Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding β-globulin in human plasma. Journ. Clin. Endocr. 26, 1366 (1966)

151) ROY, A. B.: The steroid sulphatase of Patella vulgata.
Biochem. J. 62, 41 (1956)

152) ROY, A. B.: The sulphatase of ox liver. 6. Steroid-sulphatase.
Biochem. J. 66, 700 (1957)

153) ROY, S., SLAUNWHITE, R.: Metabolic effects of commercial
B-glucuronidase preparations on estrogens.
Steroids 16, 69 (1970)

154) RYAN, K. J., SMITH, O. W.: Biogenesis of estrogens by the human ovary: I. Conversion of acetate-1-C^{14} to estrone and estradiol.
J. Biol. Chem. 236, 705 (1961)

155) RYAN, K. J., SMITH, O. W.: Biogenesis of estrogens by the human ovary: Conversion of progesterone-4- C^{14} to estrone and estradiol.
J. Biol. Chem. 236, 710 (1961)

156) RYAN, K. J., SMITH, O. W.: Biogenesis of estrogens by the human ovary: III. Conversion of cholesterol-4- C^{14} to estrone.
J. Biol. Chem. 236, 2204 (1961)

157) RYAN, K. J., ASMITH, O. W.: Biogenesis of estrogens by the human ovary: IV. Formation of neutral steroid intermediates.
J. Biol. Chem. 236, 2207 (1961)

158) RYAN, K. J., SMITH, O. W.: Biogenesis of steroid hormones in the human ovary.
Rec. Progr. Horm. Res. 21, 367 (1965)

159) RYLE, M., STEPHENSON, I., WILLIAMS, J., STUART, J.: Serum gonadotropins in young children.
Clin. Endocrin. 4, 413 (1975)

160) SAEZ, H. M., MORERA, A. M., DAZORD, A., BERTRAND, J.: Adrenal and testicular contribution to plasma oestrogens.
J. Endocrinol. 55, 41 (1972)

161) SAFFAN, B. D., BROWN, C. H., PREEDY, J. R. K.: Further comparison of maternal and fetal plasma estrogen levels at parturition.
Clin. Research 8, 246 (1960)

162) SANDBERG, A. A., SLAUNWHITE, W. R. Jr.: Studies on phenolic steroids in human subjects. II. The metabolic fate and hepatobiliary enteric circulation of C^{14}-estrone and C^{14}-estradiol in woman.
J. Clin. Invest. 36, 1266 (1957)

163) SHAKLETON, C. H. L., GUSTAFSOON, J. A., SJÖVALL, I.: Steroids in neweborns and infants. Identification of steroids urine from newborn infants.
Steroids 17, 265 (1971)

164) SHUTT, D. A.: Measurement of estradiol-17β in plasma by competitive protein-binding radioassay.
Steroids 13, 69 (1969)

165) SLAUNWHITE, W. R. Jr., SANDBERG, A. A.: Studies on phenolic steroids in human subjects: Evaluation of enzymatic hydrolysis of estrogen conjugates.
Endocrinology 67, 815 (1960)

166) SMITH, G. V. S., SMITH, O. W.: The quantitative determination of urinary oestrin.
American. J. Physiol. 112, 340 (1953)

167) SMITH, O. W., RYAN, K. J.: Biogenesis of estrogens by the human ovary: The conversion of androstenedione-4- C^{14} to estrone and estradiol in high yield.
Endocrinology 69, 869 (1961)

168) SMITH, O. W., RYAN, K. J.: Biogenesis of estrogens by the human ovary: Formation of neutral steroid intermediates from progesterone-4- C^{14} and cholesterol-4- C^{14} .
Endocrinology 69, 970 (1961)

169) STIEVE, H.: Männliche Genitalorgane. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie (Hrsg.: W. von Möllendorf)
Bd. , T.2. Berlin 1932

170) SVENDSON, R.: A double isotope derivative method for the quantitative determination of estrone and 17β-estradiol in plasma.
Acta. Endocr. 35, 161 (1960)

171) SVENDSON, R., SORENSEN, B.: The plasma concentration of conjugated oestrone and 17β-oestradiol during the normal menstrual cycle.
Acta. Endocr. 47, 245 (1964)

172) TALBOT, N. B., RYAN, J., WOLFE, J. K.: Enzymatic hydrolysis of urinary sodium pregnandiol glucuronidate to free pregnandiol.
J. Biol. Chem. 151, 607 (1943)

173) TROEN, P., NILSSON, B., WIQVIST, N., DIEZFALUSY, E.: Pattern of oestriol in human cord blood, amniotic fluid, and urine of newborns.
Acta. Endocr. 38, 361 (1961)

174) VALDES-DAPENA, M. A.: The normal ovary of childhood.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 142, 597 (1967)

175) VANDEN-HEUVEL, W. J. A., SWEELEY, C. C., HORNING, E. C.: Separation of steroids by gas-chromatography.
J. Amer. Chem. Soc. 82, 3481 (1960)

176) VEITCH, F. P. Jr., MILONE, H. S., EVERITT, E. L.: The hydrolysis of sterol-glucosides by emulsion.
Science 88, 551 (1938)

177) VERMEULEN, A., VERDONCK, L.: Studies on the binding of testosterone to human plasma.
Steroids 11, 609 (1968)

178) VERMEULEN, A., VERDONCK, L., JAN DER STRAETEN, M., ORIE, N.: Capacity of the testosterone-binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate.
Journ. Clin. Endocr. 29, 1470 (1969)

179) VOIGT, K. D.: In: Methoden der enzymatischen Analyse (ed. H. U. Bergmeyer)
Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße 1962

180) WEST, C. D., DAMAST, B. L., SARRO, S. D., PEARSON, O. H.: Conversion of testosterone to estrogens in castrated adrenalectomized human females.
J. Biol. Chem. 218, 409 (1956)

181) WIDHOLM, O., KANTERO, R. L., AXELSON, E., JOHANSSON, E. D. B., WIDE, L.: Endocrine changes before and after the menarche. I. Urinary excretion of estrogen, FSH and LH, and serum levels of progesterone, FSH and LH.
Acta. Obstet. Gynec. Scand. 53, 197 (1974)

182) WINTER, J. S. D., FAIMAN, C.: Pituitary - gonadal relations in male children and adolescents.
Pediat. Res. 6, 126 (1972)

183) WINTER, J. S. D., FAIMAN, C.: Pituitary-gonadal relations in female children and adolescents.
Pediat. Res. 7, 948 (1973)

184) WINTER, J. S. D., FAIMAN, C.: The development of cyclic pituitary-gonadal function in adolescent females.
Journ. Clin. Endocr. 37, 714 (1973)

185) WINTER, J. S. D., FAIMAN, C., HOBSON, W. C., PRASAD, A. V., REYES, F. I.: Pituitary-gonadal relations in infancy. 1. Pattern of serum gonadotropin concentrations from birth to four years of age in man and in chimpanzee.
Journ. Clin. Endocr. 40, 545 (1975)

186) WINTER, J. S. D., HUGHES, I. A., REYES, F. I., FAIMAN, C.: Pituitary-gonadal relations in infancy. 2. Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age.
Journ. Clin. Endocr. 42, 679 (1976)

187) WOTIZ, H. H., MARTIN, H. F.: Studies in steroid metabolism X. Gas chromatographic analysis of estrogens. J. Biol. Chem. 236, 1312 (1961)

188) WOTIZ, H. H., CHATTORAJ, S. C.: Determination of estrogens in low and high titer urines using thin layer and gas liquid chromatography. Anal. Chem. 36, 1466 (1964)

189) WOTIZ, H. H., DAVIS, W. J., LEMON, H. M., GUT, M.: Studies in steroid metabolism. V. Conversion of testosterone-4- C to estrogens by human ovarian tissue. J. Biol. Chem. 222, 487 (1956)

190) WOTIZ, H. H., CHARRANSOL, G., SMITH, I. N.: Gas chromatographic measurement of plasma estrogens using electron capture detector. Steroids 10, 127 (1967)

191) ZACHMANN, M.: The evaluation of testicular endocrine function before and in puberty. Acta. Endocr. 70, Suppl. 164 (1972)

192) ZANDER, J.: Steroids in human ovary. J. Biol. Chem. 232, 117 (1958)

193) ZANDER, J., BRENDLE, E., v. MÜNSTERMANN, A. M., DICZFALUSY, E., MARTINSEN, B., TILLINGER, K. G.: Identification and estimation of oestradiol-17β and oestrone in human ovaries. Acta. Obstet. Gynecol. Scand. 38, 724 (1959)

194) ZUMOFF, B., BRADLOW, L.: Quantitative extraction and separation on conjugated steroid metabolites in human urine. Journ. Clin. Endocr. 23, 799 (1963)

L E B E N S L A U F

Ursula K u h n l e

geb.	28.02.1949 in Schwäbisch Gmünd
Vater:	Dr. med. Otto Kuhnle, Facharzt für Innere Medizin
Mutter:	Agnes Kuhnle, geb. Herrmann, Hausfrau

1955	Eintritt in die Grundschule in Schwäbisch Gmünd
1959	Gymnasium in Schwäbisch Gmünd
1967	Abitur am math.-nat.-wiss. Zweig
1968	Beginn des Hochschulstudiums an der Universität München
1970	Diplom - Vorprüfung für Biologie
1972	Ärztliche Vorprüfung
1972/73	Studium an der University Medical School of Aberdeen, Schottland
1975	Ärztliche Prüfung an der Universität München
1975	Beginn der Dissertation über "Untersuchungen zur Oestrogenausscheidung im Säuglings-und Kleinkindesalter bei beiden Geschlechtern" im endokrinologischen Labor der Universitätskinderklinik München, Leiter Prof.Dr.Knorr, die durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz finanziert wurde.
Sept. 1977	Veröffentlichung der Ergebnisse meiner Arbeit auf dem "16th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endokrinology" in Cambridge, England
1.11.1977- 28.2.1978	Medizinalassistent an der Med. Klinik Innenstadt in München unter Leitung von Prof. Buchborn